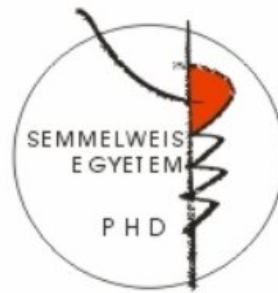


Az onkohematológiai betegségek kezelésében alkalmazott tirozin-kináz gátló imatinib és nilotinib oszteoblaszt sejtek génkifejeződéseire gyakorolt hatásának vizsgálata

Doktori értekezés

Kirschner Gyöngyi

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lakatos Péter D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy György D.Sc., egyetemi docens
Dr. Kiss Csaba Ph.D, reumatológus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szalai Csaba D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Gál Anikó Ph.D., tudományos munkatárs
Dr. Gomez Izabella Ph.D., reumatológus

**Budapest
2017**

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés	14
2.1. A csontszövet felépítése és szerepe	14
2.1.1. Oszteociták	15
2.1.2. Oszteoklasztok	15
2.1.3. Oszteoblasztok	15
2.2. Jelátviteli útvonalak	20
2.2.1. Hedgehog jelátvitel	21
2.2.2. Wnt jelátvitel	23
2.2.2.1. β -katenin függő kanonikus Wnt jelátvitel	24
2.2.2.2. Nem kanonikus PCP jelátvitel	25
2.2.2.3. Nem kanonikus Wnt/kalcium jelátvitel	25
2.2.3. Notch jelátvitel	27
2.2.3.1. Kanonikus Notch jelátvitel	27
2.2.3.2. Nem kanonikus Notch jelátvitel	28
2.2.4. TGF- β és BMP jelátvitel	29
2.3. Tirozin-kinázok és tirozin-kináz inhibitorok	32
2.4. Az onkohematológiai betegségek kezelésében használt imatinib és nilotinib csont hatásainak irodalmi áttekintése	36
2.4.1. Az onkohematológiai betegségek kezelésében elterjedten használt tirozin- kináz gátlók összefoglalása	36
2.4.2. A CML betegséget okozó legjelentősebb sejtszintű változások és a terápiában legelterjedtebben használt két tirozin-kináz gátló hatóanyag bemutatása	36
2.4.3. Az imatinib és nilotinib csontsejtekre gyakorolt hatását vizsgáló <i>in vitro</i> kísérleti eredmények irodalmi áttekintése	37
2.4.4. A tirozin-kináz gátló imatinib és nilotinib csontanyagcserét érintő, humán klinikai megfigyeléseinek irodalmi összefoglalása	38
3. Célkitűzések	40
4. Módszerek	42
4.1. MC3T3-E1 oszteoblaszt sejtek in vitro tenyésztése	42

4.2.	In vitro vizsgálatok imatinibbel és nilotinibbel	43
4.2.1.	Sejtéletképesség mérés	43
4.2.2.	PCR vizsgálatok	43
4.2.3.	A megfelelő hatóanyag-koncentráció kiválasztása.....	44
4.2.4.	Imatinibbel és nilotinibbel történő kezelések	44
4.3.	RNS izolálás	44
4.4.	SOLiD újgenerációs RNS szekvenálás (Teljes Transzkriptóma Analízis).....	45
4.4.1.	Teljes transzkriptóma analízis	46
4.4.2.	Mintagyöngy készítés	48
4.4.3.	SOLiD újgenerációs szekvenálás	48
4.5.	Génexpressziós változások statisztikai elemzése.....	49
4.5.1.	Egymintás t teszt.....	49
4.5.2.	Szignifikáns gének kiválasztása	51
4.5.3.	Jelátviteli útvonal analízis	52
5.	Eredmények.....	53
5.1.	Az imatinibbel és a nilotinibbel végzett in vitro hatóanyag-koncentrációt és kezelési időt optimalizáló kísérletek eredményei.....	53
5.2.	Szekvenálási eredmények	53
5.3.	A kezelések hatására bekövetkezett génexpressziós változások vizsgálata	56
5.4.	Szignifikánsan változott gének azonosítása.....	58
5.5.	Kanonikus útvonal elemzés	59
5.5.1.	Az imatinibbel kezelt oszteoblaszt sejteknel azonosított top kanonikus útvonalak	59
5.5.1.1.	Reelin jelátviteli útvonal	59
5.5.1.2.	Zsírsv aktivációs jelátviteli útvonal.....	60
5.5.1.3.	Gamma-amino-vajsav (GABA) receptor jelátviteli útvonal	60
5.5.1.4.	Szertoli-szertoli sejt interakciós jelátviteli útvonal	60
5.5.1.5.	γ -linolénsav bioszintézis útvonal	61
5.5.1.6.	Szerotonin receptor jelátviteli útvonal	61
5.5.2.	Az nilotinibbel kezelt oszteoblaszt sejteknel azonosított top kanonikus útvonalak	61
5.5.2.1.	Eukarióta iniciációs faktor 2 (EIF2) jelátviteli útvonal.....	61

5.5.2.2.	Embrionális őssejt differenciálódás szív sejtvonala irányba.....	61
5.5.2.3.	Az embrionális őssejtek transzkripciót szabályozó hálózata	62
5.5.2.4.	Oct4 szerepe az emlős embrionális őssejt pluripotenciában útvonal...62	
5.5.2.5.	Gamma-amino-vajsav (GABA) receptor jelátviteli útvonal	62
5.5.3.	Azonosított top upstream regulátorok	64
5.5.4.	Azonosított top molekulák	67
6.	Megbeszélés.....	71
6.1.	Az imatinib és a nilotinib kezelés hatására mért expressziós változások összegzése.....	74
6.2.	Az imatinibbel és a nilotinibbel kezelt sejtekben azonosított jelátviteli útvonalak.....	74
6.2.1.	Az imatinibbel és a nilotinibbel kezelt sejtekben azonosított GABA jelátvitel.....	74
6.2.2.	Az imatinibbel kezelt sejtekben azonosított jelátviteli rendszerek.....	75
6.2.2.1.	Reelin jelátviteli útvonal	75
6.2.2.2.	Zsírsav aktivációs jelátviteli útvonal.....	76
6.2.2.3.	Szerotonin receptor jelátviteli útvonal	76
6.2.3.	A nilotinibbel kezelt sejtekben azonosított jelátviteli rendszerek	77
6.2.3.1.	EIF2 jelátviteli útvonal.....	77
6.2.3.2.	NANOG génhez rendelt útvonalak	77
6.3.	Az imatinib és nilotinib kezelés hatására azonosított top upstream regulátorok és top molekulák.....	78
6.3.1.	Top upstream regulátorok.....	78
6.3.2.	Top molekulák.....	79
7.	Következtetések.....	81
8.	Összefoglalás	82
9.	Summary.....	84
10.	Irodalomjegyzék	86
11.	Saját publikációk jegyzéke	96
12.	Függelék	97
13.	Köszönetnyilvánítás	98

1. Rövidítések jegyzéke

ABL	Abelson egér leukémia vírus onkogén homológ (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog)
ACK	Aktivált Cdc42-kapcsolt tirozin-kináz (activated Cdc42-associated tyrosine kinase)
AcvR1/ ALK2	I-es típusú aktivin receptor (type I activin receptor)
ACVR1B	1B típusú aktivin receptor (activin receptor type-1B)
ACVR1C	1C típusú aktivin receptor (activin receptor type-1C)
AGC	A protein kináz A, G és C családok csoportja. (Named after the Protein Kinase A, G, and C families (PKA, PKC, PKG), this group contains PKA, PKG, PKC families.)
AI593442	Kromoszóma 11 nyitott leolvasási keret 87 (C11orf87, chromosome 11 open reading frame 87)
ALK	Anaplasztikus limfóma kináz (anaplastic lymphoma kinase)
ALP	Alkalikus foszfatáz (alkaline phosphatase)
APC	Vastagbél adenomatosus polyposis (adenomatous polyposis coli)
AQP9	Aquaporin 9
ATF2	Aktiváló transzkripció faktor 2 (activating transcription factor)
ATF4	Aktiváló transzkripció faktor 4 (activating transcription factor)
ATP	Adenozin-trifoszfát (adenosine triphosphate)
AXL	AXL receptor tirozin-kináz (AXL receptor tyrosine kinase)
BCR-ABL	BCR- ABL fúziós onkofehérje (breakpoint cluster region protein - Abelson murine leukemia viral onkogén homolog 1)
BGLAP	oszteokalcin (osteocalcin)
BMP	Csont morfogenikus fehérje (bone morphogenetic protein)
BMP3b	Csont morfogenikus fehérje 3B (bone morphogenetic protein 3B)
BMPRI1/ALK3	I A típusú csont morfogenikus protein receptor (type IA BMP receptor)
BMPRI1B/ALK6	I B típusú csont morfogenikus protein receptor (type IB BMP receptor)

BMPR2	2-es típusú csont morfogénikus protein receptor (BMP receptor type-2)
BNO	Betegségek nemzetközi osztályozása (international classification of diseases)
BSP	csont szialoprotein (bone sialoprotein)
CAMK	Kalcium / kalmodulin-függő protein kináz (calcium/calmodulin-dependent protein kinase)
CaMKII	Kalcium-kalmodulin-függő szerin / treonin kináz II (calcium/calmodulin-dependent serine / threonine kinase II)
CBP	CREB-kötő fehérje (CREB-binding protein)
Cdc42	Sejt osztódást szabályozó fehérje 42-es homológ (cell division control protein 42 homolog)
CK1	Kazein kináz 1 (casein kinase 1)
CKI	Kazein kináz 1 család (casein kinase 1 family)
c-kit	Őssejt faktor receptor (stem cell factor receptor)
CLIC1	Klorid intracelluláris csatorna 1 (chloride intracellular channel 1)
CMGC	A CDK, MAPK, GSK3 és CLK protein-kináz családok csoportja. (This group is named after the CDK, MAPK, GSK3 and CLK families.)
CML	Krónikus mieloid leukémia (chronic myeloid leukemia)
coSMAD	Közös közvetítő SMAD (common mediator SMAD)
CTX-1	C-terminális keresztkötés tartalmú kollagén-1 (C-terminal collagen crosslinks – 1)
CSF1	Kolónia stimuláló faktor 1 (colony stimulating factor 1)
CSF-1R (más néven: C-FMS)	Kolónia stimuláló faktor receptort (colony stimulating factor 1 receptor)
CSK	C-terminális Src kináz (C-terminal Src kinase)
CSMD1	CUB és Sushi többszörös domén 1 (CUB and Sushi multiple domains 1)
DAAM1	Dishevelled-kapcsolt morfogenezis1 aktivátor (dishevelled-associated activator of morphogenesis 1)

DAG	Diacilglicerín (diacylglyceroll)
DDR	Diszkoidin domén receptor kináz (discoidin domain receptor kinase)
DDR1 / DDR2	Diszkoidin domén receptor 1 / 2 (discoidin domain receptor 1 / 2)
DKK1	Dickkopf Wnt jelátviteli útvonal gátló 1 (dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1)
DKK4	Dickkopf Wnt jelátviteli útvonal gátló 4 (dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 4)
DSH	Dishevelled fehérje (dishevelled)
ECM	Extracelluláris mátrix (extracellular matrix)
Eda	Ektodiszlázia-A (ectodysplasin-A)
EDNRB	B típusú endotelin receptor (endothelin receptor type B)
EGF	Epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
EGFR	Epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
EIF2	Eukarióta iniciációs faktor 2 (eukaryotic initiation factor 2)
EPHR	Efrin receptor (ephrin receptor)
ePK	Eukarióta protein kináz katalitikus domén (eukaryotic protein kinase catalytic domain)
ER	Endoplazmatikus retikulum (endoplasmic reticulum)
Erk	Extracelluláris jelet szabályozó kináz (extracellular signal-regulated kinase)
FAAH	Zsírsavamid-hidroláz (fatty acid amide hydrolase)
FAK	Fokális adhézión kináz (focal adhesion kinase)
FC	Génexpressziós változás mértéke a kezelt csoportban a kontroll csoporthoz viszonyítva (fold change)
FES	Feline szarkóma, nem receptor tirozin-kináz (feline sarcoma, non receptor tyrosine kinase)
FGF	Fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)
FGFR	Fibroblaszt növekedési faktor receptor (fibroblast growth factor receptor)
FRAT1	Gyakran átrendeződött fejlett T-sejt limfóma (frequently rearranged in advanced T-cell lymphoma)

FREM2	FRAS1 fehérjéhez kapcsolt extracelluláris mátrix fehérje 2 (FRAS1 related extracellular matrix protein 2)
FRK	Fyn-kapcsolt Src nem receptor tirozin-kináz alcsalád (fyn related Src family tyrosine kinase)
FZD	Frizzled 7 transzmembrán receptor (Frizzled receptor)
GABRB1	Gamma-amino-vajsav (GABA) A receptor, béta 1 alegysége (gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 1)
GDF	Növekedési és differenciálódási faktor (growth and differentiation factor)
GDF10	Növekedési és differenciálódási faktor 10 (growth differentiation factor 10)
GEF	Guanin-nukleotid kicserélő faktor (guanine nucleotide exchange factor)
GIST	Gasztrointesztinális sztróma tumor (gastrointestinal stromal tumor)
GLDN	Gliomedin
Gli	Glioma-kapcsolt onkogén családba tartozó fehérje (glioma-associated oncogene family member)
GliA	Gli aktivátorok
Gm11225	3-hidroxi-izobutirát dehidrogenáz pszeudogén (predicted gene 11225, 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase pseudogene)
GNAQ	Guanin nukleotid kötő fehérje, alfa q polipeptid (guanine nucleotide binding protein, alpha q polypeptide)
GPCR	G-protein kapcsolt receptor (G protein–coupled receptor)
GRIP1	Glutamát receptorral kölcsönható fehérje 1 (glutamate receptor interacting protein 1)
Gsk3	Glikogén szintáz kináz-3 (glycogen synthase kinase 3)
Gsk3 β	Glikogén szintáz kináz 3 béta (glycogen synthase kinase 3 beta)
GWAS	Genomszintű asszociációs vizsgálatok (genome-wide association studies)
HDAC	Hisztón deacetiláz (histone deacetylases)
HIF1A	Hipoxia indukációs faktor 1, alfa alegység (hypoxia inducible factor 1, alpha subunit)

HYDIN	HYDIN, axonéma centrális pár apparátus fehérje (HYDIN, axonemal central pair apparatus protein)
IFT	Intraflagelláris transzport (intraflagellar transport)
IGF	Inzulinszerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)
INSR	Inzulin receptor család (insulin receptor and associated kinases)
IP3	Inozitol-1,4,5-trifoszfát (inositol 1,4,5-trisphosphate)
JAK	Janus kináz (Janus kinase)
JNK	c-Jun N-terminális kináz (c-Jun amino-terminal kinase)
Kif7	Kinezin család 7. tagjaként ismert szabályozó fehérje (kinesin family member 7)
KLHL41	Kelch-szerű fehérjecsalád 41. tagja (Kelch-like 41)
KSH	Központi Statisztikai Hivatal
Lmr	Lemur, receptor tirozin kináz (Lemur, receptor tyrosine kinase)
logFC	A kezelt csoportban a kontroll csoporthoz viszonyított expressziós változás mértékének logaritmus (log Fold Change)
LRP	Alacsony denzitású lipoprotein kapcsolt fehérje (low-density lipoprotein related protein)
LTK	Leukocita tirozin kináz (leukocyte tyrosine kinase)
MAML	Mastermind-szerű fehérje (Mastermind-like)
MARCH7	Membránkötött ring ujj (C3HC4) 7, E3 ubiquitin fehérje ligáz (membrane-associated ring finger (C3HC4) 7, E3 ubiquitin protein ligase)
MC3T3-E1	Egér oszteoblaszt sejtvonal (mouse osteoblastic cell line)
M-CSF	Makrofág kolónia stimuláló faktor (macrophage-colony stimulating factor)
MET	MET proto-onkogén, receptor tirozin-kináz (MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase)
MKKs	MAPK jelátviteli útvonalak (MAPK pathway member-encoding genes kinases-p38 MAPK)
mRNS	Hírvivő ribonukleinsav (messenger ribonucleic acid)
MSCs	Mezenchimális őssejtek (mesenchymal stem cells)
MUSK	Izom specifikus kináz (muscle-specific kinase)

MYO3B	Miozin IIIB (Myosin IIIB)
NANOG	Nanog homeobox
NECD	Notch receptor extracelluláris doménje (Notch extracellular domain)
NFAT	aktivált T sejtek nukleáris faktora (Nuclear factor of activated T cells)
NICD	Notch intracelluláris doménje (Notch intracellular domain)
NLK	Nemo-szerű kináz (Nemo-like kinase)
NRCAM	Neuronális sejt adhéziós molekula (Neuronal cell adhesion molecule)
NYAP2	Neuronális tirozin-foszforilált foszfoinozítid-3-kináz adaptor2 (Neuronal tyrosine-phosphorylated phosphoinositide-3-kinase adaptor2)
OPG	Oszteoprotegerin (osteoprotegerin)
OSX	Oszterix (osterix)
p38-MAPK	p38 mitogén aktivált protein kináz (p38 mitogen-activated protein kinase)
PBS	Foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
PCP	Poláris sejt polaritás (planer cell polarity)
PDE	Foszfodiészteráz (phosphodiesterase)
PDGF	Vérlemezke / trombocita eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor)
PDGF-R	Vérlemezke / trombocita eredetű növekedési faktor receptor (platelet-derived growth factor receptor)
PKA	Protein kináz A (protein kinase A)
PKC	Protein kináz C (protein kinase C)
PLC	Foszfolipáz C (phospholipase C)
Ptc	Patched
Ptch	Patched receptor
PTH	Parathormon (parathyroid hormone)
PTHrP	Parathormon-szerű peptid / protein (parathyroid hormone-related protein)
RAD23B	RAD23 homológ B (élesztő gomba) (RAD23 homolog B (S. cerevisiae))

RANK	Receptoraktivátor nukleáris faktor κ B (receptor activator of nuclear factor κ B)
RANKL	Receptoraktivátor nukleáris faktor κ ligand (receptor activator of nuclear factor κ B ligand)
RBP κ	Immunoglobulin kappa J régió rekombinációs jel kötő fehérjéje (recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region)
RELN	Reelin
RET	RET receptor tirozin-kináz (RET receptor tyrosine kinase)
RGC	Receptor guanilát ciklázok csoportja (receptor guanylate cyclases)
RNA-Seq	RNS szekvenálás (RNA sequencing)
ROCK	Rho-asszociált protein kináz (Rho-associated protein kinase)
ROR	Árva receptor, receptor tirozin-kináz (receptor orphan, receptor tyrosine kinase)
ROR2	Receptor tirozin-kináz szerű árva receptor 2 (receptor tyrosine kinase like orphan receptor 2)
ROS	ROS protoonkogén, receptor tirozin kináz (ROS proto-oncogene, receptor tyrosine kinase)
RPL17	riboszómális protein L17 (ribosomal protein L17)
RPL39	Riboszómális protein L39 (ribosomal protein L39)
RPS23	Riboszómális fehérje S23 (ribosomal protein S23)
R-SMAD	receptor szabályozott SMAD fehérjék (receptor regulated SMADs)
RT-PCR	Reverz transzkripció mediálta PCR meghatározás (reverse transcription polymerase chain reaction)
RUNX2	Runt kötött transzkripciós faktor 2 (runt-related transcription factor-2)
RYK	Receptor-szerű tirozin kináz (receptor-like tyrosine kinase)
SCF	Őssejt faktor (stem cell factor)
SEV	Sevenless receptor tirozin-kináz (sevenless receptor tyrosine kinase)
sFRPs 1–5	Frizzled-kapcsolt fehérjék 1-5 (frizzled-related proteins 1-5)
SLITRK5	SLIT és NTRK-szerű család, 5. tagja (SLIT and NTRK-like family, member 5)

SMAD	C. elegans protein (Sma) és Drosophila protein (MAD) homológ (Sma and Mad related family)
Smo	Smoothed fehérje (smoothed)
SMURF1	SMAD specifikus E3 ubikvitin fehérje ligáz 1 (SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1)
SMURF2	SMAD specifikus E3 ubikvitin fehérje ligáz 2 (SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2)
SRB	Szulfrodamin-B (sulforhodamine-B)
SRC	Szarkóma nem receptor tirozin-kináz (Src non receptor tyrosine kinase)
STE	Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 élesztő kináz homológok (homologs of yeast Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 kinases)
STXBP5L	Syntaxin kötő fehérje 5-szerű (syntaxin binding protein 5-like)
Sufu	Fused homológ szupresszor (suppressor of fused homologue)
Syk	Spleen nem receptor tirozin kináz (spleen non receptor tyrosine kinase)
TAB1	TAK1-kötő fehérje 1 (TAK1-binding protein 1)
TAK1	TGF- β -aktivált kináz 1 (TGF- β -Activated Kinase 1)
Tec	Tec protein tirozin kináz (tec protein tyrosine kinase)
TGF	Transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)
TGFBR2	2-es típusú TGF-béta receptor (TGF-beta receptor type-2)
TGF β	Transzformáló növekedési faktor béta (transforming growth factor beta)
TIE	Tirozin-kináz receptor az endotheliális sejtekben (endothelial receptor tyrosine kinase)
TK	Tirozin-kináz (tyrosine kinase)
TKL	Tirozin-kináz szerű (tyrosine kinase-like)
TNF	Tumor nekrosis faktor
Trk	Tropomizin receptor tirozin-kináz (tropomyosin tyrosine kinase)
VEGF	Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)

VEGFR	Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor (vascular endothelial growth factor receptor)
VLDLR	Nagyon alacsony denzitású lipoprotein receptor (very low density lipoprotein receptor)
WIF1	Wnt gátló faktor 1 (Wnt inhibitory factor 1)
Wnt	Wingless, a Wnt rövidítés a Wnt család első két felfedezett tagjának (int-1, wingless) a név összetételéből származik
WTA	Teljes transzkriptóma analízis (whole transcriptome analysis)
ZFP184	Cink ujj fehérje 184 (Zinc finger protein 184)
β -Ttcp	Béta-transzducin ismétlődéseket tartalmazó E3 ubiquitin protein ligáz (beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase)
7TM	7 transzmembrán receptor (7 transmembrane receptor)

2. Bevezetés

Jelen tanulmány létrejöttét a nemzetközi szakirodalomban ismertetett, tirozin-kináz gátlókkal végzett tanulmányok megfigyelései motiválták. Számos klinikai vizsgálat igazolta, hogy egyes onkohematológiai betegségek kezelésében használt Breakpoint Cluster Region-Abelson fúziós onkofehérje (BCR-ABL) specifikus tirozin-kináz gátlók, mint például az imatinib, hatással vannak a csontanyagcserére. A kezdeti kutatások során, több tudományos munka számolt be arról, hogy hatásukra jelentős csonttömeg növekedést figyeltek meg [1-11]. De a folyamatok pontos hatásmechanizmusairól és a jelátviteli utak működésének változásairól kevés ismeret állt rendelkezésre.

A jelátviteli útvonalaknak a feltárására az utóbbi évek módszertani fejlődése révén korszerű új módszerek váltak elérhetővé. Jelen terület a tudomány egyik új, dinamikusan fejlődő területe, amely megoldást kínálhat különböző betegségek hatékonyabb gyógyítására. Akár, egyénre szabott módon.

Jelen kutatás célja, az imatinib és a BCR-ABL gátlásra szelektívebb nilotinib egér oszteoblaszt sejtek génkifejeződéseire gyakorolt hatásainak vizsgálata in vitro rendszerben transzkriptomikai szinten. A teljes transzkriptóma analízis során a sejtben kifejeződő összes mRNS szintjét kvantitatív módon meghatározva kialakítható az a géncsoport, mely a használt tirozin-kináz gátlók hatására a csontsejtekben eltérő módon expresszálódik. Ezekből a génekből jelátviteli útvonal analízis végezhető. Az útvonalanalízissel azonosított jelátviteli útvonalak, top upstream regulátorok és top molekulák hozzájárulnak a tirozin-kináz gátlók oszteoblaszt sejtek génkifejeződéseire gyakorolt hatásainak mélyebb megértéséhez.

2.1. A csontszövet felépítése és szerepe

A csont egy dinamikusan változó élő szövet, meghatározza a test alakját, és biztosítja az izmok eredési és tapadási helyeit. Szilárdságának köszönhetően, mint passzív mozgásszerv, részt vesz a mozgás támogatásában, és a szervek védelmében. Ezen kívül részt vesz az ásványi anyag homeosztázishoz kapcsolódó metabolikus folyamatokban, az ionok raktározásában és anyagcseréjében, valamint a vérvérvetésben és az immunvédelemben is [12, 13]. A csonthomeosztázist, mechanikai-, kémiai-, elektromos- és mágneses hatások révén kialakult, extracelluláris jelek hatására, a csontsejtekben

(oszteoblaszt, oszteocita, oszteoklaszt) aktiválódott jelátviteli útvonalak által indukált kémiai folyamatok sokasága határozza meg [12]. A csontszövetet felépítő csontsejtek három típusát különböztetjük meg: oszteocita, oszteoblaszt és oszteoklaszt sejtek.

Mivel munkánk során oszteoblaszt sejteket vizsgáltunk, ezért ennek a sejttípusnak a bemutatására részletesebben kitérek.

2.1.1. Oszteociták

Az érett csontszövetben az oszteociták fordulnak elő a legnagyobb mennyiségben. A canaliculusokban elhelyezkedő nyúlványaikon keresztül hálózatot alkotó lacunákban található oszteociták, a csontépítő oszteoblaszt sejtekből keletkeznek. Az oszteociták lapos, nyújtott sejtek, sejtmagjuk sötét és sok kromatint tartalmaz. Ezek a sejtek, a csontra ható mechanikai és kémiai hatások receptorai. Hatással vannak többek között a remodelingre, a mineralizálódott csontszövet anyagcsere-szabályozására és a csontszövet tápanyag-ellátására is [13].

2.1.2. Oszteoklasztok

A csontsejtek másik nagy típusa a csontbontó oszteoklaszt sejtek. Az oszteoklaszt sejtek pluripotens haemopoetikus őssejtekből több lépcsős folyamatban alakulnak ki. Habár léteznek egy magvú oszteoklaszt sejtek is, általában több mononuklearis oszteoklaszt fúziójával létrejött óriás sejtékként fordulnak elő. Csontbontó sejtékként, a csontszövet sejt közötti állományát bontja le. A szervetlen állományt savas kémhatás létrehozásával, az így szabaddá vált szerves állományt pedig enzimek segítségével bontja le [13]. Az oszteoklasztok a csontbontás mellett, immunológiai és hematológiai folyamatok szabályozásában is részt vesznek [13].

2.1.3. Oszteoblasztok

Az oszteoblasztok korlátlan osztódásra képes multipotens mezenchimális őssejtekből (MSCs) származnak. Az MSCs az embrionális élet során alakulnak ki a mezodermából, azonban a kifejlett egyedekben már nem alkotnak külön szövetet, viszont megtalálhatók több szövet típusban is (például: csontvelő, perifériás vér, fogpulpa, lép, köldökzsinórvér). A csontvelő őssejteknek fontos szerepe van a csont anabolikus folyamataiban [15]. A csontvelői mezenchimális őssejtek aszimmetrikus osztódás révén önmegújulásra, valamint leánysejt és többféle progenitor sejtet keresztül különböző sejt

differentiálódásra (például: oszteoblaszt, oszteocita, adipocita és kondrocita) is képesek. Transzkripciós faktorok és egyéb befolyásoló tényezők hatásától függően alakul ki belőle az adott sejttípus. Az őssejtekből leánysejteken keresztül kialakuló, korlátozott önmegújulásra képes oszteokondrális bipotens progenitor sejtekből oszterix (OSX) és runt kötött transzkripciós faktorok (RUNX2) jelenlétében preoszteoblaszt sejtek, végül oszteoblaszt sejtek lesznek. Az érett oszteoblasztok tovább már nem osztódnak. Az oszteoblasztogenezis, azaz az oszteoblasztok kialakulása és a csontképzés összetett, bonyolult folyamatok eredménye, melyek során számos szignálfehérje, növekedési faktor és hormon vesz részt. A lejátszódó folyamatok részletei még teljesen nem ismertek.

Az oszteoblaszt sejtek 15-20 μm átmérőjű, mononukleáris, sejtszervecskékben gazdag, köb alakú, aktív anyagcserét folytató sejtek. Egy csontképző helyen, egy rétegben, rendezetten, egymás mellett általában 100-400 sejtől álló csoportok helyezkednek el az épülő csont felszínén. A kerek sejtmag a csontfelszínnel ellentétes oldalon található. A sejtmagban található nukleóluszok száma 1-3 lehet. A sejtmag és a sejt apikális része között számos sacculussal rendelkező fejlett Golgi-készülék, és több endoplazmatikus retikulum is elhelyezkedik. Az oszteoblaszt sejtek között a jelátvitel nyúlványaikon keresztül vagy gap junctionokon keresztül valósul meg [13].

Az oszteoblaszt sejtek működését parakrin (például: TGF β család, FGF-ek, IGF-ek, BMP-k, IL-6), autokrin (például: TGF β család, FGF-ek, IGF-ek, BMP-k, PDGF) és endokrin (például: parathormon, glükokortikoid, kalcitonin, inzulin, D vitamin) faktorok is befolyásolják. Plazmamembránjához nagy mennyiségben kötődnek általuk termelt csont specifikus enzimek (például: a csontmineralizációs folyamatokban fontos alkalikus foszfatáz (ALP), csontreszorpcióban résztvevő kolónia stimuláló faktor 1 (CSF1), receptoraktivátor nukleáris faktor k ligand (RANKL), citokinek). Az oszteoblasztok főként I típusú kollagént, és nem kollagén típusú fehérjéket (például: oszteokalcin (az extracelluláris mátrixfehérjék 1%-a), oszteonektin, oszteopontin, csont szialoprotein) termelnek. A preoszteoblaszt és az érett oszteoblaszt sejtek fejlődése során az ALP, csont szialoprotein, kollagén, oszteokalcin, oszteopontin fontos markerek. Az oszteoblasztok csont-anyagcserét szabályozó faktorokat is termelnek, mint például, csont morfogenetikus proteinek (BMP), trombocita növekedési faktorok (PDGF), béta transzformáló növekedési faktorok (TGF β), fibroblaszt növekedési faktorok (β FGF), inzulinszerű növekedési faktorok (IGF). A főként oszteoblasztok által termelt [16-18], csontszövetben

található növekedési faktorok, a nem kollagén fehérjék kevesebb, mint 1%-át alkotják, de az oszteoblaszt és oszteoklaszt sejtek működésének befolyásolásán keresztül, a csontsejt metabolizmus nagyon fontos szabályozói [16]. A csontépítés folyamán beépülnek az extracelluláris mátrixba [19], és a mátrixba épülve maradnak a remodeling vagy egy trauma hatására bekövetkezett kioldódásukig [16]. Habár egyelőre nem ismerjük még az összes növekedési faktort, számos csontanyagcseréhez köthető faktort sikerült már azonosítani (például: BMP, EGF, FGF, IGF, PDGF, TGF, VEGF). A csontanyagcseréhez köthető, főbb növekedési faktorok összefoglalása a 1. táblázatban látható.

Csontépítő sejtként az oszteoblasztok fő feladata, egy már létező felületen, az extracelluláris mátrix kialakítása. Az extracelluláris mátrix, a sejtek által termelt és ezt követően a sejten kívüli térbe jutott molekulák összessége, ami a körülötte lévő sejtek, szerkezeti támogatását és biokémiai folyamatait segíti. Segíti például a sejt adhéziót és a sejtek közötti kommunikációt (például a proteinglikánok negyedleges szerkezetükkel és töltésükkel támogatják a vízterek kialakulását az extracelluláris mátrixban, ennek köszönhetően pedig segítik a sejtek közötti kommunikációhoz és az anyagcseréhez (tápanyag bejutását a sejtbe és az anyagcsere végtermékek kijutását) szükséges molekulák diffúzióját). Az extracelluláris csontmátrix kocsonyás alapállományból, ásványi anyagokból és rostokból áll. A csontsejtek által szekretált molekulák, dinamikus hálózatából álló extracelluláris mátrixhoz a sejtek transzmembrán fehérjéikkel kapcsolódnak [19].

Az oszteoblasztok által létrehozott nem kalcifikált csontmátrix fehérjét köt meg a keringésből és létrejön a gélszerű oszteoid. A sejt szekréciós oldalán lévő citoplazma nyúlványai, mélyen behatolnak az oszteoid mátrixba, ahol kapcsolatot hoznak létre az oszteociták nyúlványaival. 10 nap múlva megkezdődnek a csont szilárdságát biztosító mineralizációs folyamatok, azaz az ásványi anyag lerakódás, kalciumból és foszforból álló hidroxipatit kristályok beépülésével. Ennek hatására az újonnan képződött csontnál is kialakulnak a csontra jellemző mechanikai tulajdonságok. Az oszteoblaszt sejtek egy része (körülbelül 15%-a) beépül az általuk termelt csontmátrixba, ahol lacunát hoznak létre magunknak, és oszteocitává alakulnak, míg másik részük csontfelszíni ellapult szegélysejté alakul át.

Az oszteoblasztok szerepe a csontreszorpcióban

Habár az oszteoblasztok fő feladata a csontépítés, fontos szerepet töltenek be a csontreszorpcióhoz kapcsolódó folyamatokban is. Számos reszorpciót stimuláló anyag (parathormon (PTH), prosztaglandin, szteroid, ösztrogén, D₃-vitamin, integrin molekulák, citokinek) oszteoblaszt receptorokhoz kötődik. Ezen kívül expresszálnak citokineket, CSF1-et, RANKL-t. A RANKL központi szerepet játszik az oszteoklasztogenezis parakrin aktivációjában a RANK-RANKL rendszeren keresztül. Az oszteoblasztok által expresszált RANKL, lehasad az oszteoblaszt felszínéről és beköt az oszteoklasztok felszínén lévő RANK-hoz. Így a RANKL a RANK receptoron keresztül aktiválja az oszteoklasztogenezist. Ugyanakkor, a szintén oszteoblasztok által termelt szolúbilis RANKL receptorként ható oszteoprotegerin (OPG) RANKL-hoz kötődve, megakadályozza a RANKL-RANK kapcsolódást így gátolja az oszteoklasztok keletkezését [13].

Az oszteoblasztok neutrális proteázok szekréciójával roncsolják az oszteoidot és így előkészítik a csontfelszínt az oszteoklasztoknak [12].

A modeling során az építő és bontó folyamatok nem kapcsolódnak szorosan egymáshoz. Ezzel szemben a remodelingben a reszorpció és formáció szoros és rendkívül összetett kapcsolata figyelhető meg.

1. táblázat A csontszövet növekedését stimuláló növekedési faktorok. A csont a növekedési faktorok raktára. A csontokban található növekedési faktorok többsége támogatja a csontépítési folyamatokat. Termelődésüket a helyi mechanikus stressz és a szisztémás hormonok egyaránt befolyásolják. A növekedési faktorok, speciális sejtfelszíni receptoraikhoz kötődve, összetett sejten belüli jelátviteli folyamatok hatására, a sejtmagban létrejött génaktiváción illetve inaktiváción keresztül, számos sejtszintű folyamat szabályozásában vesznek részt [16, 19, 20] (például: sejtnövekedés [19], sejttérés, proliferáció [16, 17, 20], differenciálódás [16, 17, 19, 20], túlélés [19], osztódás [19], migráció [16, 20], sejt replikáció [16], génexpresszió [16, 20], szekréciós működés [16], metabolizmus [16], csontgyógyulás [16, 19, 21]).

Növekedési faktor	Receptor csoport	Rövid leírás
BMP (csont morfogénikus fehérje)	szerin / treonin kináz	A BMP család a TGF β szupercsaládba tartozik. Erős csontszövet növekedést indukál, de számos más szövet (például: porc) növekedésére is hat. Szabályozza a növekedést, a differenciálódást és az apoptózist. Támogatják például a MSCs, sejtek differenciálódását oszteoprogenitor sejtekké, és serkenti azok oszteoblaszt sejtvonallá differenciálódását [16]. Oszteoinduktív fehérjeként, fontos szerepük van a csontnövekedés és a csontgyógyulás lokális folyamataiban [17]. A törés gyógyulás korai szakaszában is megfigyelték az expresszáladásukat [16].
EGF (epidermális növekedési faktor)	Tirozin-kináz (EGFR)	Fontos szerepe van számos sejtípus növekedésében, proliferációjában és differenciálódásában. A gyógyulási folyamatokban vesz részt [20].
FGF (fibroblaszt növekedési faktor)	Tirozin-kináz (FGFR)	A csontmátrixban található bázikus FGF (FGF2) mennyisége nagyobb, mint a savas FGF (FGF1) mennyisége [16]. Erős angiogén faktor és mitogén [16]. Az FGF2 támogatja az oszteoblaszt sejtek proliferációját. Aktiválja az oszteoblaszt sejteket. Támogatja a csontépítést és részt vesz a csontregenerációban. Más növekedési faktorok szintézisét is stimulálják. Számos sejt (epitélialis sejt, miocita, kondrocita, oszteoblaszt) növekedését és differenciálódását támogatják.
IGF (inzulinszerű)	Tirozin-kináz (IGFR)	A csontmátrixban található IGFII mennyisége nagyobb, mint az IGF1 mennyisége [16]. Angiogenikus növekedési faktorok. Stimulálják az oszteoprogenitor sejtek proliferációját és

növekedési faktor)		differentiálódását [16]. Részt vesznek a csontregenerációban és csontgyógyulást indukálnak. Támogatják a csontnövekedést [17]. Az IGFII serkenti az I-es típusú kollagén termelődését.
PDGF (vérlemezke eredetű növekedési faktor)	Tirozin-kináz (PDGFR)	Hatása van a csontképződéssel kapcsolatos biokémiai folyamatokra. Angiogenikus növekedési faktor, és mitogén hatása van a csontsejtekre. A sejtek növekedését és osztódását szabályozza. Szabályozza a mezenchimális sejtek növekedését is. Stimulálja az oszteoblaszt proliferációt. Részt vesz az oszteoblaszt sejtek reszorpciós „lyukba” történő kemotaktikus migrációjának támogatásában [16]. Serkenti a mátrix protein szintézist [16]. Részt vesz a csont regenerációban és csontgyógyulást indukál.
TGF (transzformáló növekedési faktor)	Szerin / treonin kináz	Multifunkciós nagy fehérje géncsalád. A TGF β angiogenikus növekedési faktort a csont és a vérlemezék nagy mennyiségben tartalmaznak. Legnagyobb mennyiségben a csontokban található. Szabályozza a MSCs, az oszteoprogenitor valamint az oszteoblaszt sejtek proliferációját, differenciálódását, növekedését és a metabolizmusát. Az oszteoblaszt és oszteoklaszt sejtek egyaránt szintetizálják és érzékelik. Az oszteoblaszt sejteknek van a legtöbb TGF β receptora. Támogatja az oszteoblaszt sejtek kemotaktikus migrációját a reszorpciós „lyukba” [16]. Növeli a csontsűrűséget [20] és stimulálja a csontépítést [16]. Részt vesz a csontnövekedésben, a csontregenerációban, és csontgyógyulást indukál.
VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor)	Tirozin-kináz (VEGFR)	Angiogenikus növekedési faktor, részt vesz a csont regenerációban, és csontgyógyulást indukál.

2.2. Jelátviteli útvonalak

A jelátviteli útvonalak meghatározó szerepet töltenek be az oszteoklaszt és oszteoblaszt sejtek működésének szabályozásában, ezáltal a csontszövet valamennyi tulajdonságának (például: csont ásványianyag-tartalom, csontsűrűség, csonttömeg) kialakításában.

A csont-homesztázisának fenntartása szigorú szabályozást igényel, ezért az oszteoblaszt és oszteoklaszt sejtek differenciálódását és működését, több jelátviteli rendszer is

szabályozza. Az oszteoblaszt csontépítést szabályozó jelátviteli útvonalak közé tartozik többek között a Wnt, aktivin A, BMP, PTH, PTHrP, nitroglicerín, TGF- β , Hedgehog és az FGF is. A oszteoblaszt csontépítéshez kapcsolódó útvonalak közül, csak a legjelentősebb útvonalak (Hedgehog, Wnt, Notch, TGF- β , BMP) rövid bemutatására térek ki.

2.2.1. Hedgehog jelátvitel

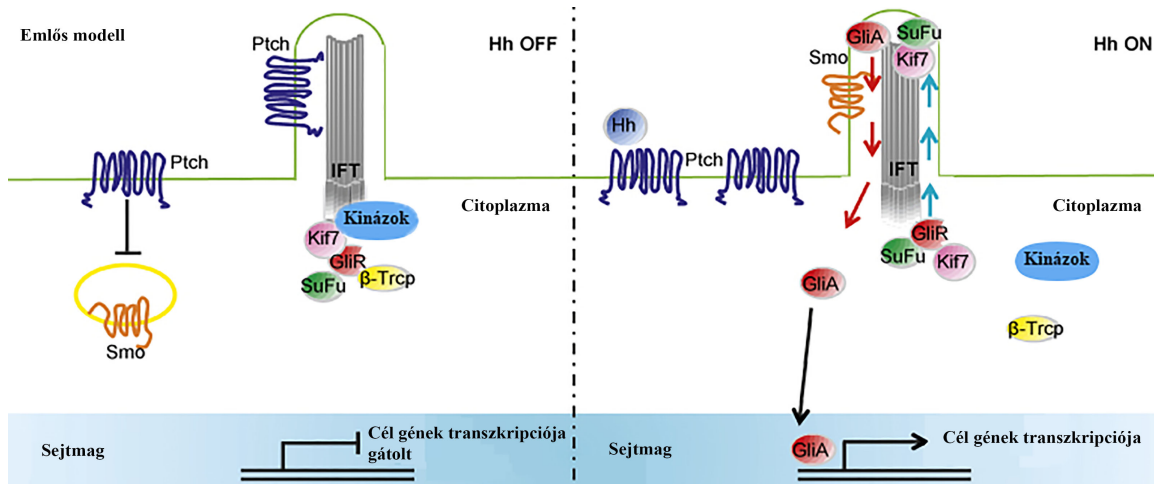
A Hedgehog jelátvitelnek fontos szerepe van a csontfejlődésben és a homeosztázisban. Az emlősökben jelenlévő Hedgehog homológ fehérjék (sonic hedgehog, indian hedgehog, desert hedgehog [22]) által közvetített jelátvitel hat a sejtproliferációra és differenciálódásra [22]. A Hedgehog útvonal nem megfelelő működése súlyos csontbetegségek kialakulását eredményezheti (például: tumor képződés) [22].

A jelátvitelben résztvevő komponensek mozgásának, valós idejű és fiziológiai szintű követésére egyelőre nincsenek kidolgozott módszerek, ezért a folyamat teljes részletében még nem ismert [23]. A külön sejt organelumot (elsődleges csillót) igénylő, emlősöknél azonosított jelátvitel fő komponensei, a Hedgehog fehérjék, a 12 transzmembrán (TM) régiót tartalmazó Patched (Ptch) receptor, a 7 TM régióból álló Smoothed (Smo) fehérje, kinázok, Glioma-kapcsolt onkogén családba tartozó (Gli) transzkripciós faktorok, béta-transzducin ismétlődéseket tartalmazó E3 ubikvitin protein ligáz (β -Trcp), valamint a fused homológ szupresszor (Sufu) és kinezin család 7. tagjaként ismert szabályozó fehérjék (Kif7). A Sufu és Kif7 az emlős Hedgehog jelátvitel két kulcs szabályozója [23]. A Sufu negatívan, míg a Kif7 pozitívan és negatívan is képes szabályozni a jelátvitelt [23]. Az útvonal aktivációja sejt-sejt kapcsolattal, valamint szolúbilis liganddal is létrejöhet [22].

Hedgehog fehérje hiányában, a Ptch receptor gátolja a citoplazmában elhelyezkedő Smo fehérjét. Ebben az esetben a foszforilált Gli fehérjék, a β -Trcp, a Kif7, a kinázok (protein kináz A (PKA), kazein kináz 1 (CK1), glikogén szintáz kináz-3 béta (Gsk3 β)) és a Sufu az elsődleges csilló alapjánál helyezkednek el [22, 23]. A Sufu negatívan szabályozza a jelátvitelt a citoplazmában azáltal, hogy gátolja a Gli2 transzkripciós aktivátor aktivitását [23], valamint azáltal, hogy a Gli3 fehérjék aktivátor és represszor formájának egyensúlyát, a represszor forma irányába tolja el, és ezzel gátolja a Gli3 fehérjék transzkripciós aktivátorrá alakulását [23]. A PKA akadályozza a teljes hosszúságú Gli2

akkumulációját a csillóban [23], valamint beindít egy foszforilációs kaszkádot, amiben a PKA, GSK3 β , CK1 foszforilálják a teljes hosszúságú Gli3 fehérjét. A foszforilált Gli3 fehérjét a β -Trop felismeri, hozzákötődik, és az ubikvitinációt követően a Gli3 fehérje proteasómába kerül. A Kif7 és a kinázok a jelátvitelt azáltal gátolják [22], hogy támogatják a Gli3 transzkripciós faktor proteasóma által közvetített proteolitikus folyamatait, melynek következtében a létrejött represszor hatással rendelkező GliR gátolja, a Hedgehog target gének expresszióját a sejtmagban [23]. Ezen események együttesen biztosítják a Hedgehog jelátvitel gátoltságát a ligand hiánya esetén.

Hedgehog ligand jelenlétében a ligand beköt a Ptch receptorhoz és az Smo gátlás megszűnik. Ennek hatására az Smo felhalmozódik a csilló membránjában és foszforilálódik. Ez felfüggeszti a PKA működését, és ezáltal a Kif7-Gli-Sufu komplex a csilló alapjától a csilló tetejébe vándorol intraflagelláris transzporttal (IFT=kétirányú mozgás a mikrotubulusokban) [22]. A Gli2/3 csillóba jutását a Kif7 is támogatja [23]. Aktivált Hedgehog jelátvitel esetén a Kif7 feldúsul a csilló tetejénél [23]. A folyamatban a Kif7 nemcsak a fehérje vándorlást segíti, hanem gátolja a Sufu működését is, és a kötések felbomlását is támogatja a Gli 2/3 és Sufu között [22]. A Gli2/3 akkumulációja a csilló tetejénél összefügg a Gli aktivátorok (GliA) termelődésével [23]. A Hedgehog útvonal aktiválódásakor a GliR gyártás gátolt, és a teljes hosszúságú Gli proteinekből (főleg Gli2) GliA aktivátorok képződnek. A GliA visszavándorol a sejtmagba, ahol aktiválja a Hedgehog target gének expresszióját (például: Ptch1, Gli1, Hhip1) [22, 23]. Ezért az Smo felhalmozódása az elsődleges csillón, együtt jár a csilló tetejénél, valamint a sejtmagban a Gli fehérjék mennyiségének megnövekedésével [23]. A Gli fehérjék aktiválódásának részletei még nem teljesen ismertek. A Hedgehog jelátvitel sematikus összefoglalóját a 1. ábra mutatja be.



1. ábra Hedgehog jelátvitel sematikus ábrája (kép forrása: [22])

2.2.2. Wnt jelátvitel

Az evolúciósan erősen konzervált wingless (Wnt) autokrin vagy parakrin jelátvitel megannyi sejttípus, számos sejtszintű folyamataira van hatással, mint például a proliferáció, differenciálódás, polaritás, migráció, apoptózis. Számos különböző folyamatban azonosították már a szerepüket (például: embriogenezis, szervfejlődés, tumorképződés). A Wnt útvonalak fontos szerepet játszanak továbbá a trabekuláris és a kortikális csontképződés stimulálásában, a csonttömeg, valamint a csont ásványianyagtartalom kialakulásában is. A Wnt útvonalak egyaránt hatnak a modeling során az intramembránózus és endokondrális csontépítésre, valamint a remodeling során a csontépítés és reszorpció egyensúlyára, az oszteoblaszt és az oszteoklaszt képződés és működés befolyásolásán keresztül.

A Wnt családdhoz tartozó 19 szekretált glikoprotein receptorai a Frizzled (FZD) 7 TM G-protein kapcsolt receptorok (GPCR), valamint az egyes útvonalak aktiválódásához szükséges társreceptorok (például: alacsony denzitású lipoprotein kapcsolt fehérje (LRP), receptor-szerű tirozin-kináz (RYK) vagy a receptor tirozin-kináz szerű árva receptor 2 (ROR2)). Mivel 19 különböző Wnt ligandot, 10 különböző 7 TM FZD receptort és 3 LRP (LRP4-6) társ receptort különböztetünk meg, ezért az útvonal nagyon összetett. Attól függően, hogy melyik Wnt fehérje aktiválja az adott útvonalat, a csontsejtekre gyakorolt hatás különböző lehet (például: a WNT5a támogatja, míg a WNT4, WNT16 gátolja a RANKL indukálta oszteoklaszt képződést [24]). Az útvonal aktiválódásának mértékét számos gátló molekula jelenléte módosíthatja. Az útvonal összetettségét tovább

bonyolítja, hogy a Wnt útvonalaknak több fajtája van. Megkülönböztetünk β -katenin függő kanonikus útvonalat, illetve β -katenintől és LRP-től független nem kanonikus poláris sejt polaritás (PCP)-, valamint Wnt/kalcium útvonalakat. Ezek interakcióba léphetnek egymással is és más útvonalakkal is [24].

A Wnt jelátvitel gátlása többféleképpen is történhet. Vagy a Wnt ligandhoz kötődnek gátló molekulák (mint például: Frizzled-kapcsolt fehérjék (sFRPs 1–5), WNT gátló faktor 1 (WIF1)) ami egyaránt vezethet a kanonikus és nem kanonikus útvonalak gátlásához is, vagy a gátló molekulák (például: szklerosztin vagy a Dickkopf 1 (DKK1) fehérje) az LRP-FZD receptor kapcsolat kialakulásának megakadályozásával, a kanonikus Wnt jelátvitelt gátolják.

2.2.2.1. β -katenin függő kanonikus Wnt jelátvitel

Ez az útvonal a géntranszkripciót szabályozza.

Amikor az FZD és az LRP nem kötődik a Wnt ligandhoz a β -katenin szintje a citoszolban alacsonyan van, mert egy Axin- glikogén szintáz kináz-3 (Gsk3) - CK1- vastagbél adenomatous polyposis (APC) heterotetramer komplex Gsk3 tagja az újonnan szintetizálódó β -katenineket és az Axin molekulákat foszforilálja. A foszforilált β -kateninek ubiquitinálódnak és a proteaszmában degradálódnak.

Ha a Wnt ligand bekötődik az FZD és az LRP receptorokhoz, a kanonikus útvonal aktiválódik. Az FZD intracelluláris részével hozzá kötődik a dishevelled (DSH) fehérjéhez, ami doménjeinek foszforilációjával aktiválódik, és a Gsk3 foszforilálásával, gátolja annak működését [25]. Az Axin a komplexből kilépve, a gyakran átrendeződött fejlett T-sejt limfóma (FRAT1) proto-onkogénnel együtt hozzákötődik az LRP-hez, és az LRP foszforilálódik. A Gsk3 gátlásával, a nem foszforilált β -kateninek felhalmozódnak a citoplazmában és bekerülnek a sejtmagba, ahol a TCF/LEF transzkripciós faktor inhibitorát (Goucho) leszorítják, és a β -kateninek kötődnek a transzkripciós faktorhoz. A TCF/LEF transzkripciós faktorokat kötő DNS szakaszokhoz (reszponzív elemekhez) kötődéssel, az oszteoblaszt sejtekben, olyan gének transzkripciója indukálódhat, amik az oszteoblaszt differenciálódásban és a csontépítésben vesznek részt [24]. Például a kanonikus Wnt jelátvitel az OPG expressziót transzkripciós szinten támogatja a β -katenin / TCF komplex OPG promoterhez kötődésével. A Wnt indukálta Runx2 transzkripció szabályozza a RANKL és OPG expresszióját is [25] [2. ábra].

2.2.2.2. Nem kanonikus PCP jelátvitel

A sejt alakját meghatározó citoskeletont szabályozza.

A PCP útvonal β -katenintől és LRP-től független. Ebben az útvonalban a Wnt ligand receptora a kanonikus útvonalnál megismert FZD, transzmembrán társ receptora viszont vagy a RYK vagy a ROR2. A PCP útvonal aktiválódása esetén a Wnt/FZD/(RYK vagy ROR2) receptor heterotrimer komplex aktiválja a DSH fehérjét a citoplazmában, ami a Dishevelled-kapcsolt morfogenezis 1 aktivátor (DAAM1) fehérjével kapcsolódik, ami guanin-nukleotid kicserélő faktor (GEF) segítségével aktiválja a Rho vagy Rac1 kis G fehérjéket. Ettől a ponttól ez az útvonal két fő jelátvitelre oszlik. Az egyik jelátvitel, amelynek során az aktivált Rho aktiválja a citoskeletont szabályozó Rho-asszociált protein-kinázt (ROCK), sejt mozgást vagy szövet polaritást eredményez. A másik jelátvitel során a DSH/DAAM1 által aktivált Rac1 kis G fehérje aktiválja a c-Jun N-terminális kinázt (JNK), ami a c-Jun és az aktiváló transzkripciós faktor 2 (ATF2) transzkripciós faktorok aktiválódásán keresztül aktin polimerizációhoz vezet, amiből a citoskeleton egyik alkotója a mikrofilamentum-rendszer épül fel [2. ábra].

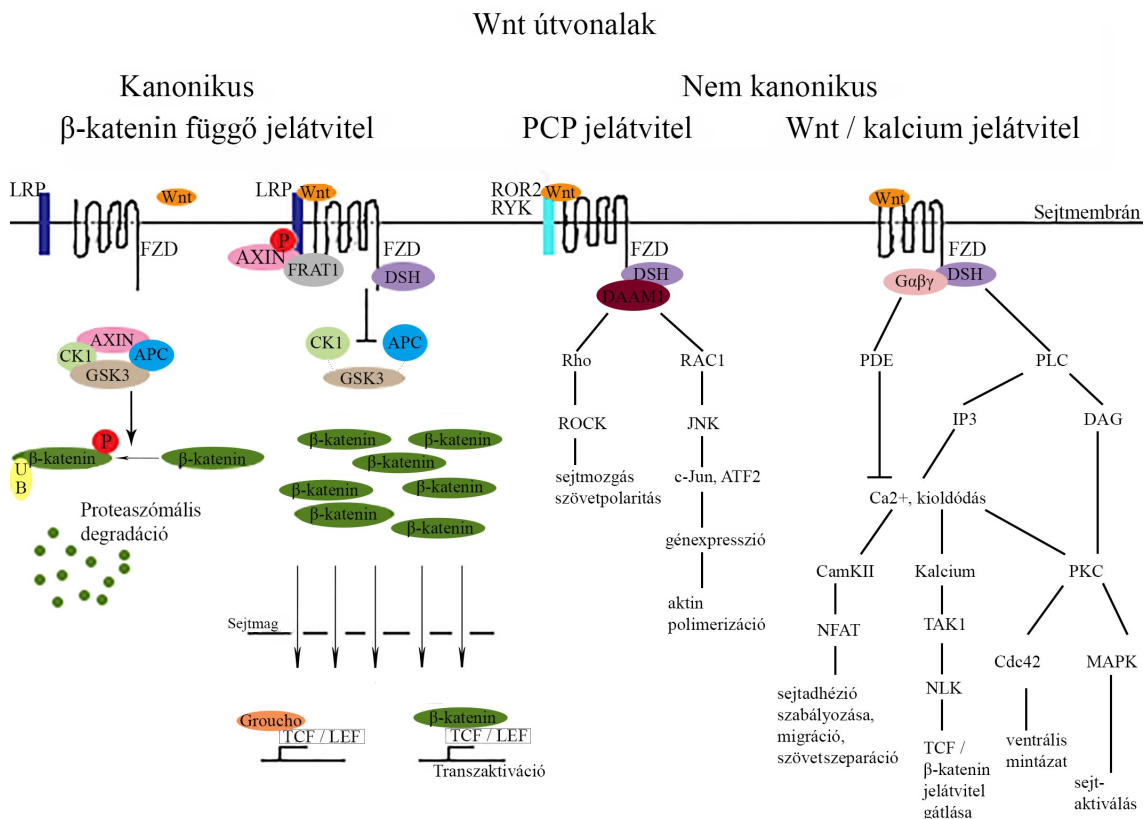
2.2.2.3. Nem kanonikus Wnt/kalcium jelátvitel

Ez a jelátviteli útvonal a kalcium endoplazmatikus retikulumból (ER) való kioldódásának szabályozásán keresztül, kontrollálja az intracelluláris kalcium-szintet.

A Wnt/kalcium jelátvitel a PCP jelátvitelhez hasonlóan független a β -katenintől és az LRP-től. A ligand kötődés itt is aktiválja az FZD receptort, ami közvetlen kölcsönhatásba lép a DSH fehérjével, melynek hatására ebben az esetben is speciális DSH fehérje domének (DEP, PDZ) aktiválódnak. Azonban a többi Wnt útvonaltól eltérően itt, az FZD receptor közvetlenül kapcsolódik egy trimer G fehérjéhez is. A DSH és a trimer G fehérje együttes aktiválása vagy a membránhoz kapcsolt foszfolipideket hasító foszfolipáz C (PLC) vagy a foszfodiészter kötéseket hasító foszfodiészteráz (PDE) enzim aktiválódáshoz vezet.

Ha a PLC aktiválódik, a membrán kicsi foszfolipid komponense a foszfatidil-inozitol 4,5 biszfoszfát két másodlagos hírvívó molekulára, diacilglicerinre (DAG) és inozitol-1,4,5-trifoszfátra (IP3) bomlik. Amikor az IP3 az ER-on lévő receptorához kötődik, a kalcium kiszabadul. A megnövekedett kalcium szint és a DAG, protein-kináz C (PKC) segítségével, aktiválja a sejt osztódást szabályozó fehérje 42-es homológot (Cdc42), ami

a ventrális mintázatért felelős. A megnövekedett kalciumszint a kalcium-kalmodulin-függő szerin / treonin foszfatáz kalcineurint és a kalcium-kalmodulin-függő szerin / treonin kináz II (CaMKII) fehérjét is aktiválja. A kalcineurin aktiválja a TGF- β -aktivált kináz 1 fehérjét (TAK1) és Nemo-szerű kinázt (NLK), ami a kanonikus útvonalban a TCF/ β -katenin jelátvitelt gátolja. A CaMKII indukálja az aktivált T-sejtek nukleáris faktor (NFAT) transzkripció faktor aktiválódását, ami sejt adhéziót, migrációt és szövet szeparációt szabályoz. Az NFAT és az Oszterix közösen részt vesznek az oszteoblaszt differenciálódás és a csontépítés támogatásában [25]. A DAG a PKC aktiváción keresztül aktiválja a mitogén aktivált fehérje kinázokat (MAPK) is, amik számos sejt aktivitásban részt vesznek [24]. De ha a PDE aktiválódik, a kalcium kioldódás az ER-ből gátolt [2. ábra].



2. ábra Wnt útvonalak áttekintése: Mindhárom útvonal a Wnt ligand GPCR családba tartozó 7TM FZD receptor N-terminális cisztein gazdag extracelluláris doménjéhez kötődésével aktiválódik. A folyamathoz a Wnt/kalcium jelátvitel kivételével társ receptorok (LRP vagy RYK vagy ROR2) szükségesek. Ezt követően az FZD receptor az extracelluláris biológiai jelet a sejt belsejében lévő DSH fehérjéhez közvetlenül

továbbítja. A DSH több doménnel rendelkezik, így számos fehérjéhez képes kötődni, ezzel biztosítva a Wnt útvonalak sokféleségét.

2.2.3. Notch jelátvitel

A Notch útvonal szintén evolúciósan erősen konzervált jelátviteli rendszer, ami jelen van a legtöbb többsejtű élőlény számos sejtípusában (többek között például csontsejtekben). Az embrionális fejlődésben, valamint a felnőtt szövetek önmegújulásban és homeosztázisában fontos juxtakrin (közvetlen sejt – sejt) interakciók kialakításában vesz részt, valamint más jelátviteli rendszerekkel (például: Wnt, BMP [26]) is kölcsönhatásba lép. Jelentős szerepet tölt be a Notch jelátvitel a csontok fejlődésében és homeosztázisában is.

Az oszteoblaszt és oszteoklaszt sejtekben hatással van a sejt proliferációra, [27] differenciálódásra [26, 27] és működésre [26]. Azonban az útvonal csontrendszerre gyakorolt hatásának irányát vizsgáló tanulmányok eredményei ellentmondásosak [26, 27], és a függenek a sejtek érettségi állapotától [26] és a sejtek kontextusától.

A Notch jelátvitel csontsejtekre gyakorolt jelentős hatásának következtében, a nem megfelelően működő Notch jelátvitel számos csontvázrendszerrel kapcsolatos betegséget (például: Hajdu-Cheney szindróma [26], Alagille szindróma [26, 28], Spondylocostal dysostosis [28]) okozhat.

2.2.3.1. Kanonikus Notch jelátvitel

A Notch jelátvitel sejt- sejt kapcsolatot igényel, és akkor aktiválódik, ha az egyszeres transzmembrán ligand kapcsolódik a szomszédos sejtfelületen lévő 4 Notch egyszeres transzmembrán receptor (Notch1, Notch2, Notch3, Notch4) valamelyikéhez [26]. Ha azonban a ligand és a receptor egy sejten van, akkor az aktiváció gátolt [29]. Az emlősökben azonosított 12 Notch ligand szerkezetük alapján 4 csoportra osztható: 1) DSL (Delta/Serrate/LAG-2)/ DOS (Delta and OSM-11-like proteins) ligandok: Delta-like 1 (DLL 1) Jagged 1 (JAG1), Jagged 2 (JAG2); 2) Csak DSL részt tartalmazó ligandok: DLL3, DLL4; 3) DOS társ ligandok: DLK1, DLK2; 4) Nem kanonikus ligandok: DNER, MAGP1, MAGP2, F3/contactin1, NB3/contactin6 [27, 30, 31].

A ligand bekötődése a receptor extracelluláris részéhez, a Notch receptor két egymás utáni proteolitikus hasításához vezet [26, 27]. A ligand receptorhoz való kötődését követően, a Notch receptor extracelluláris doménjét (NECD) mettaloproteázok

(ADAM17, ADAM10) lehasítják [27], és a ligand–NECD komplex, a ligand intracelluláris részének ubikvitinációjától függő endocitózissal a ligandot expresszáló, jelküldő sejt belsejébe jutnak [27, 31]. Az endocitózist követően, a jelküldő sejt belsejében zajló jelátviteli folyamatok részletei, ezáltal az endocitózis szerepe a jelátvitel aktivációjában egyelőre nem ismertek. A NECD lehasítását követően a jelfogadó sejtben egy γ -secretase komplex kihalásítja a receptor transzmembrán (TM) részét is [27]. Ezáltal a Notch intracelluláris doménje (NICD) leválik a plazma membránról és a sejtmagba vándorol [26, 27].

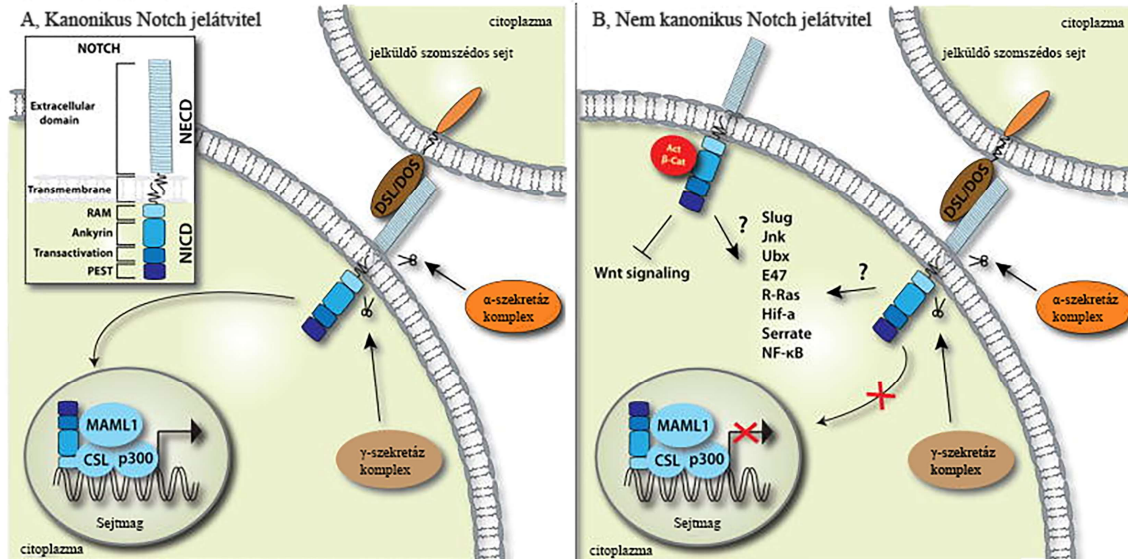
A sejtmagban a NICD, a represszor és aktiváló komplex kialakítására egyaránt képes immunoglobulin kappa J régió rekombinációs jel kötő fehérje (RBPjk, más néven CBF1 vagy CSL) DNS-kötő fehérjével kapcsolódik, leszorítja a ko-represszorát (Mint/Sharp/SPEN, NCoR/SMRT, KyoT2 [30]), és kialakul a transzkripciós koaktivátor Mastermind-like 1-3 (MAML1-3) és egyéb transzkripciós ko-aktivátorokat tartalmazó, HES/ESR/HEY target gének expresszióját szabályozó, aktiváló komplex [26, 29, 30]. A transzkripció aktivációs folyamata során a NICD foszforilálódik és E3 ubikvitin ligázok által ubikvitinálódik végül a proteasómában degradálódik [29, 30]. Fontos megjegyezni, hogy a jelátvitel aktiválódásának feltétele a ligand-receptor kölcsönhatást követő receptor proteolízis és a ligand-NECD endocitózis, ezáltal a Notch sejtfelszíni receptorok csak egyszer képesek a jelet közvetíteni [3. ábra].

A Notch jelátvitel főként kanonikus ligandok által aktiválódik, de szerkezetileg különböző nem kanonikus ligandok is aktiválhatják a jelátvitelt és hozzájárulhatnak a jelátvitel pleiotróp hatásához. Viszont a kanonikus Notch útvonallal ellentétben, a nem kanonikus útvonal részleteiről, és annak csontsejtekre gyakorolt hatásairól kevés információ áll rendelkezésre, és a jelenlegi kutatások tárgyát képezik.

2.2.3.2. Nem kanonikus Notch jelátvitel

A nem kanonikus Notch útvonal független a hasítástól, a sejtmagi lokalizációtól [32], az RBPj fehérjétől és lehet ligand függő vagy ligand független. A nem kanonikus ligandok (DNER, MAGP1, MAGP2, F3/Contactin1, NB-3/Contactin6 [27, 30, 31]) szerkezetileg változatos transzmembrán vagy szolúbilis fehérjék, amik képesek a kanonikus és a nem kanonikus útvonalak szabályozására is [28]. A nem kanonikus útvonal mediátorainak nagy része ismeretlen. Továbbá csak néhány génről ismert, hogy hat rá ez a jelátvitel.

Jelenleg az emlősök esetében, nincsen megfelelő vizsgálati módszer a nem kanonikus útvonal működésének tanulmányozására in vivo [32]. A nem kanonikus Notch jelátvitel sematikus ábrája a 3. ábrán látható.



3. ábra Notch jelátvitel vázlatos összefoglalása (kép forrása: [32]).

2.2.4. TGF- β és BMP jelátvitel

A TGF- β szupercsaládba több mint 40 szerkezetileg hasonló sejt szabályozó fehérje tartozik [33], különböző alcsaládokba sorolva (például: TGF- β , BMP, növekedési és differenciálódási faktor (GDF), Nodal, aktivin és inhibin). A TGF- β szupercsaládba tartozó fehérjék által indukált jelátvitel több sejttípus működésére is hatnak, beleértve a csontsejteket is. Az eddigi kutatások eredményei alapján, az ide tartozó jelátviteli utak közül a TGF- β és a BMP jelátvitel rendelkezik a legjelentősebb csonthatással.

A TGF- β és a BMP jelátvitel nem megfelelő működése számos csontbetegséget okozhat [33] (például: tumor metasztázis [34], A2-es típusú brachydactylia [34], oszteoarthritis [33, 34], oszteoporózis [35]). Mindkét jelátvitel szigorúan szabályozott (szabályozza például: ligand és R-SMAD agonista, R-SMAD és receptor ubikvitináció). Kölcsönhatásba lépnek egymással (TGF- β /BMP jelátvitel) is és más citokin jelátviteli útvonallal (például: Wnt, Hedgehog, Notch, FGF) is [33].

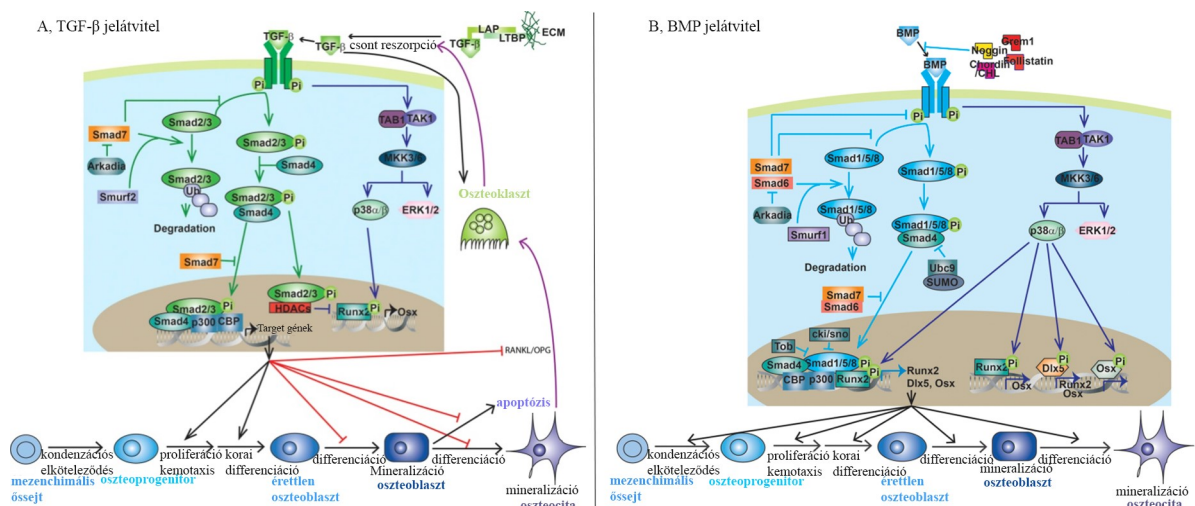
A TGF- β és a BMP ligandok, speciális 2-es típusú dimér sejt felszíni receptoraikhoz (TGFR2, / BMPR2, AMHR2, ActR2A, ActR2B) kötődésével megindul a jelátvitel. A 2-es típusú szerin /treonin-kináz receptorok, megkötnek két 1-es típusú receptort [33], és az így kialakult heterotetramer receptor komplexben [33], a kettes típusú receptor dimér

katalizálja az 1-es típusú receptor dimér szerin oldalláncainak foszforilációját [33]. Ezáltal az 1-es és 2-es típusú receptorok a jelet a citoplazmába közvetítik, ahonnan kanonikus SMAD függő jelátvitellel (TGF- β /BMP ligandok, receptorok, Smad fehérjék) vagy nem kanonikus SMAD független jelátvitellel (p38 mitogén-aktivált protein kináz (p38 MAPK) kaszkádok) a sejtmagba jut az információ [33, 34, 36-38].

A kanonikus SMAD függő jelátvitel esetén az 1-es típusú receptor által foszforilált speciális receptor-szabályozott SMAD fehérjék (R-SMAD: SMAD2, SMAD3 / SMAD1, SMAD5, SMAD8) komplexet alkotnak a Smad4 fehérjével (közös közvetítő SMAD, coSMAD), ami ezt követően a sejtmagba transzlokálódik, ahol ko-faktorokkal kapcsolódnak [33] és transzkripció faktoroként hatva részt vesznek a mRNS transzkripció szabályozásán keresztül a target gének expressziójának szabályozásában [33]. A nem SMAD függő jelátvitelben, a foszforilált TAK1 hozzákötődik az 1-es TAK1-kötő fehérjéhez (TAB1) és ezzel elindítja az MKK-p38 MAPK vagy az MKK-ERK1/2 jelátviteli kaszkádot [33].

A TGF- β és a BMP jelátvitelek végül, az oszteoblaszt differenciálódásban és a csontépítésben fontos gének (mint például: RUNX2, CREB-kötő fehérje (CBP), p300, Dlx5, oszterix (Osx)) transzkripcióját befolyásolják [33].

A két jelátviteli útvonal vázlatos illusztrációja a 4. ábrán látható.

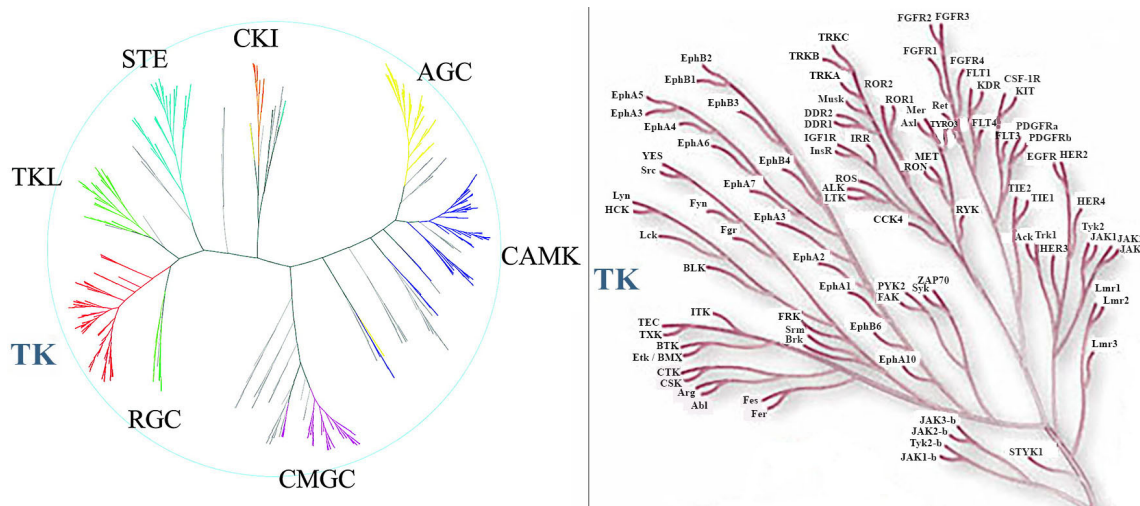


4. ábra TGF- β és BMP jelátvitel összefoglaló ábrája (képforrása: [33]). A SMAD7, gátolja a SMAD jelátvitelt azáltal, hogy gátolja az R-Smad foszforilációt, valamint azáltal, hogy gátolja az R-smad/co-Smad komplex kialakulását és a sejtmagba való

bejutását. A SMAD6 az 1-es típusú BMP receptorhoz kötődve gátolja a Smad1/5/8 aktivációját, valamint a SMAD4-hez kötődésével megakadályozza, hogy az a többi SMAD fehérjéhez kötődjön. A SMAD specifikus E3 ubikvitin fehérje ligáz (SMURF)1 (SMURF1) és SMURF2 szabályozza a SMAD fehérjék szintjét. A SMURF2 és a SMAD7 együtt az R-SMAD ubikvitinációján és a proteasomális degradáción keresztül gátolja a jelátvitelt. Ezzel szemben az Arkadia támogatja a SMAD jelátvitelt azáltal, hogy támogatja az I-SMAD (SMAD6/7) ubikvitinációját és degradációját. Ubc9/SUMO komplex támogatja a SMAD4 proteasomális degradációját [33].

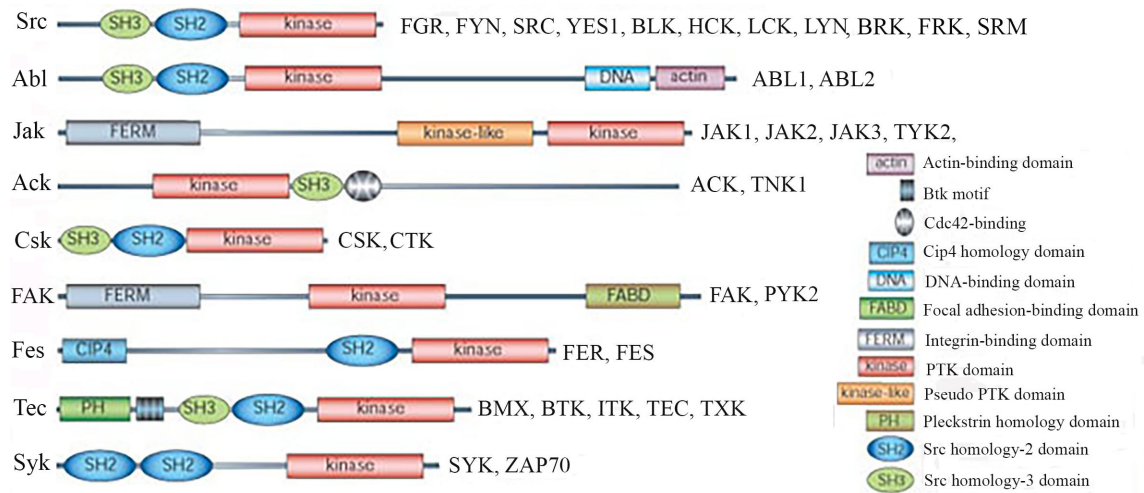
2.3. Tirozin-kinázok és tirozin-kináz inhibitorok

A protein-kinázok, az eukarióta sejtek jelátviteli útvonalainak többségében nagyon fontos szabályozó szerepet töltenek be. Olyan enzimekként működnek, melyek más fehérjék működését foszfát csoport hozzákapcsolásával módosítják. Normál körülmények között a működésük szigorúan kontrollált és szabályozott. A kináz fehérjék megkötik a szubsztrát fehérjét és az ATP-t, és az ATP-ről a foszfát csoportot átteszik a szubsztrát fehérjére. A folyamat eredménye ADP, és foszforilált szubsztrát. A foszfátcsoporthoz vagy automatikusan leválik, vagy foszfatázok választják le. A tirozin oldalláncokat foszforiláló protein kinázok, a tirozin-kinázok [5. ábra].



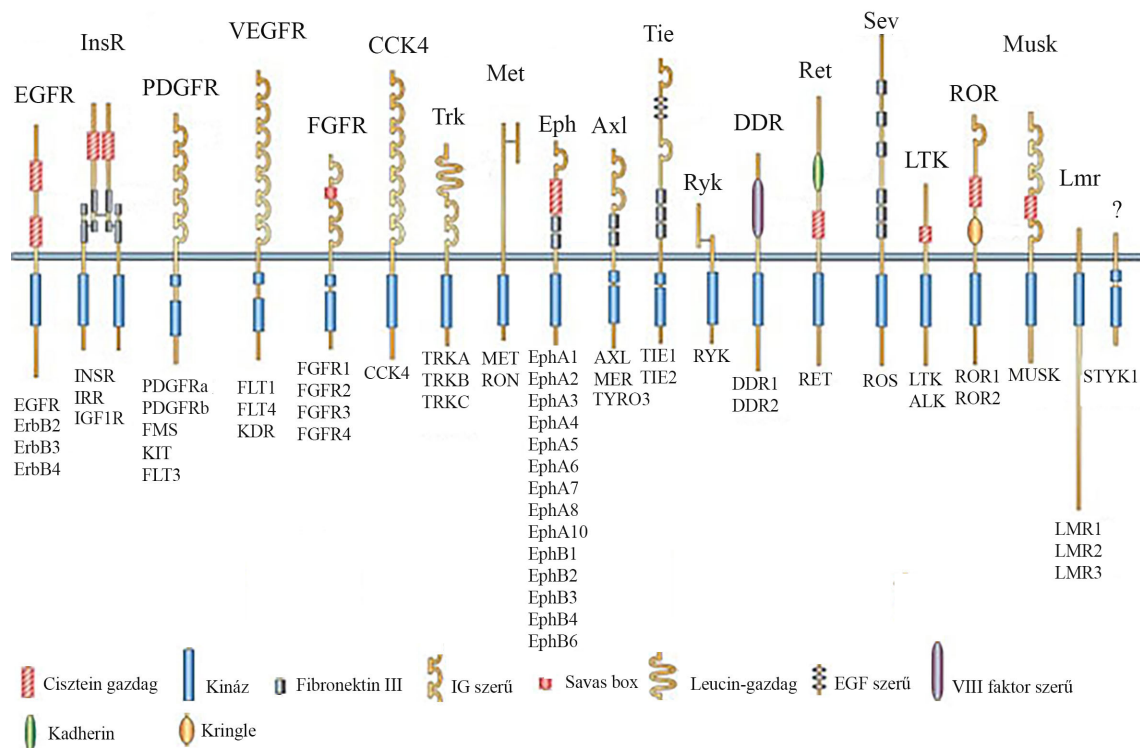
5. ábra A kinom és a tirozin-kinázok kapcsolata (a bal oldali kép forrása: [39], a jobb oldali kép forrása: (<http://www.cellsignal.com/>)). A kép bal oldalán a kinom, jobb oldalán pedig a tirozin-kináz fa látható. Kinom, azaz az emberi genomban megtalálható összes ismert protein kináz (a teljes humán kinom fa a függelékben, a 14. ábrán látható). A legtöbb protein kináz tartalmazza az eukarióta protein kináz (ePK) katalitikus domént, és ezért egy szupercsaládba sorolhatóak. A protein kinázok óriási géncsaládjába tartoznak többek között (TKL, STE, CKI, AGC, CAMK, CMGC, RGC) a tirozin-kinázok is [39]. A tirozin-kinázok a sejtek közötti kommunikációban vesznek részt, ezért csak a többsejtű metazoan élőlényeknél (például: állat, ember) azonosíthatóak. A tirozin-kinázok gyakran közvetítenek növekedést, differenciálódást, adhéziót, motilitást és sejtpusztulást kiváltó jeleket. Embereknél számos betegség kialakulása (például: cukorbetegség, rákos megbetegedések), köthető a tirozin-kinázokhoz. Az emberi tirozin-kinázokat 20 receptor tirozin-kinázra és 9 nem receptor tirozin-kinázra lehet osztani [14].

A tirozin-kinázok nem receptor tirozin-kinázokra és receptor tirozin-kinázokra oszthatóak. A nem receptor tirozin-kinázok [6. ábra] a citoplazmában a sejtfelszínhez közel vagy akár a plazmamembránhoz horgonyozva helyezkednek el, és kapcsolatban vannak a receptorokkal.



6. ábra Nem receptor tirozin-kináz család (kép forrása: [40]). Az emberi genomban azonosított 90 tirozin-kináz génből, 32 gén nem receptor tirozin-kinázt kódol. Ezt 32 nem receptor tirozin-kinázt 9 családra lehet osztani. Az Src családot további 4 alcsaládra (SrcA, SrcB, Frk és SRM) lehet osztani. Az ábra bal oldalán a nem receptor tirozin-kináz családok, a jobb oldalán az adott családhoz tartozó gének vannak jelölve. A nem receptor tirozin-kinázok a sejtmagban, citoplazmában vagy a membrán belső felszínéhez kapcsolódva találhatók.

A receptor tirozin-kinázok, tirozin-kináz enzimaktivitással bíró receptorok [7. ábra]. A receptor tirozin-kinázok sejtfelszíni transzmembrán receptorok, melyek képesek saját maguk vagy szubsztrátjuk tirozin oldalláncainak foszforilációjára [41].



7. ábra Receptor tirozin-kináz család (kép forrása: [40]). A 24 emberi kromoszómából 19 kromoszómánál (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 22, X) azonosítottak tirozin-kináz géneket [14]. Összesen az emberi genomban 90 tirozin-kináz gént azonosítottak, melyből 58 receptor tirozin-kináz fehérjét kódol. Ezt az 58 receptor tirozin-kinázt 20 családra lehet osztani. A családokat a különböző intron / exon mintázatok alapján lehet elkülöníteni. Egy családba tartozó tirozin-kinázok, azonos intron / exon mintázattal rendelkeznek [14]. A családok nevei felül, a családokhoz tartozó 58 receptor tirozin-kináz gén az ábra alján van feltüntetve. A „?” egy ál családot jelez, amihez olyan géneket sorolnak, amik a TK csoportba tartoznak, de nem lehet elhelyezni őket az ismert TK családok egyikében sem. A receptorok sematikus ábrázolásából jól látszik, hogy a receptor tirozin-kinázok extracelluláris része rendkívül változatos, ezzel szemben a transzmembrán és intracelluláris részük hasonlóságot mutat. A receptor tirozin-kinázok növekedési faktorok, citokinek és hormonok receptorai.

A receptor tirozin-kinázok extracelluláris részükkel érzékelik az extracelluláris jeleket. A ligand kötődése után dimerizálódnak, és ezt követi az intracelluláris tirozin oldalláncok transzfoszforilációja. A tirozin-kináz receptor intracelluláris része a foszforilációt követően számos különböző funkcióval rendelkező foszforilált tirozin oldalláncot

tartalmaz. A foszforilált oldalláncokat, az SH2 doménnel rendelkező fehérjék felismerik (az SH1 domén a tirozin-kináz domén). Végül kialakul a jelátviteli komplex (a komplex tagjai például: enzimek, transzkripció faktorok, szabályozók). Ez a változás a sejten belül különböző jelátviteli kaszkád folyamatokat aktivál, melyek a sejtmagban génátírást vagy génátírás nélküli sejt anyagcsere változást okoznak.

A tirozin fehérjék foszforilációja, a sejt közötti kommunikációt is nagyon erősen befolyásolja. A fehérje foszforilációnak fontos szerepe van a fejlődés során, a fiziológias válaszokban, a homeosztázisban, valamint az idegrendszer- és az immunrendszer működésében [39]. A protein kinázok többek között a szubsztrát aktivitást, a sejtciklus, az extracelluláris stimulusokra adott választ, a metabolizmust, a transzkripciót, a sejtmozgást, az apoptózist és a differenciálódást is befolyásolják [39].

A kináz enzimek rendellenes működése, számos betegség kialakulását eredményezheti. Mivel a tirozin-kináz receptorok általában növekedési faktorok receptorai, és ezáltal a sejtek differenciálódási, növekedési illetve aktivációs folyamataiban vesznek részt [42], ezért, a napjainkban korszerű célzott tumor terápiák során, a túlzottan növekedő és korlátlanul osztódó tumoros sejtek jelátvitelében résztvevő tirozin-kináz enzimek működését, kis molekulájú tirozin-kináz gátló hatóanyagokkal igyekeznek gátolni. Ezek a hatóanyagok egyaránt képesek a sejtfelszíni receptorok és az intracelluláris jelátviteli fehérjék gátlására is, melynek eredményeként gátolják a sejtnövekedést, proliferációt, inváziót [41]. A gyógyszerkutatások során egyre több kismolekulájú gyógyszert és antitestet fejlesztenek a tirozin-kináz enzimek gátlására. Több ilyen célra kifejlesztett hatóanyag is kapható már kereskedelmi forgalomban.

Az általunk vizsgált onkohematológiai betegségek kezelésében használt tirozin-kináz gátló imatinib és nilotinib, a tumor sejtekben jelen lévő BCR-ABL tirozin-kináz enzim működését specifikusan képes gátolni.

2.4. Az onkohematológiai betegségek kezelésében használt imatinib és nilotinib csonthatásainak irodalmi áttekintése

2.4.1. Az onkohematológiai betegségek kezelésében elterjedten használt tirozin-kináz gátlók összefoglalása

A tirozin-kináz gátlók, bizonyos onkohematológiai betegségek kezelésében elterjedten használt gyógyszerek. Az első tirozin-kináz gátló gyógyszerhatóanyag az imatinib volt, melyet 2001-ben engedélyezett az Amerikai Gyógyszerügyi Hatóság (U.S. Food and Drug Administration, FDA) a krónikus mieloid leukémiás (CML) betegek számára [43]. Azóta a világ egyre több országában egyre több beteg részesül imatinib terápiában. A CML betegekben kimutatható BCR-ABL fúziós fehérje gátlására használt tirozin-kináz gátlók közül, a hazai és nemzetközi szakmai irányelvek alapján, a kezelések során először imatinibet (Glivec, 2001) alkalmaznak. Ha az imatinib kezeléssel nem érik el a beteg állapotának javulását (nincs remisszió, rezisztencia alakul ki vagy imatinib intolerancia lép fel), akkor a hatályban lévő eljárásrend alapján alkalmazható a nilotinib (Tasigna, 2007) vagy a dasatinib (Sprycel, 2006). Azoknál a betegeknél, ahol sem az imatinib kezelés nem javasolt, és nilotinibre, valamint dasatinibre sem reagálnak megfelelően alkalmazható a ponatinib (Iclusig, 2013) és a bozutinib (Bosulif, 2013) is [44].

2.4.2. A CML betegséget okozó legjelentősebb sejtszintű változások és a terápiában legelterjedtebben használt két tirozin-kináz gátló hatóanyag bemutatása

A CML a fehérvérsejtek egy részét létrehozó csontvelő mieloid őssejtvonalát érinti. A betegséget a BCR-ABL génfúziót hordozó ún. *Philadelphia*-kromoszóma jellemzi, melynek következtében túlzott mennyiségű kóros fehérvérsejt termelődik. A CML betegségre jellemző *Philadelphia*-kromoszóma a 22-es és a 9-es kromoszóma reciprok transzlokációjával jön létre t(9;22)(q34;q11). A 22-es kromoszóma hosszú karján kialakul a BCR-ABL onkogén, amiről egy hibás BCR-ABL fúziós fehérje íródik át. Ez a konstitutívan aktív tirozin-kinázként működő intracelluláris fehérje folyamatosan foszforilálja szubsztrátjait, amelyek sejtproliferációs, differenciálódási kaszkádokat indítanak el. Ez a kontrollálatlan sejtosztódás az, ami CML sejtek folyamatos termelődését eredményezi [44].

Az imatinib a leukémiás sejtek intracelluláris terébe speciális transzporterek segítségével jut, ezzel szemben a nilotinib esetén nem azonosították a pontos transzport mechanizmust, feltételezik, hogy a sejtbejutás főként passzív folyamatok révén valósul meg. A tirozin-kináz inhibitorok a CML sejtekben - ATP kompetitív vegyületeként - a BCR-ABL fehérje inaktív konformációjához kötődődnek és gátolják annak aktivitását. Ezzel megakadályozzák a tumorsejtek proliferációját és azokban apoptózist indukálnak. Számos klinikai vizsgálat tanulmányozta a BCR-ABL specifikus tirozin-kináz gátlók biológiai hatásait, mint a farmakokinetikai és farmakodinamikai tulajdonságok, mellékhatás spektrum, különböző receptorokhoz való viszonyaik, illetve sejten belüli viselkedésük. A tanulmányok közül néhány igazolta, hogy ezek a hatóanyagok komplex módon befolyásolják többek között a csontanyagcsere folyamatokat is [2. táblázat] [44].

2.4.3. Az imatinib és nilotinib csontsejtekre gyakorolt hatását vizsgáló *in vitro* kísérleti eredmények irodalmi áttekintése

Az imatinib és nilotinib csonthatása valószínűleg a csontsejtek fiziológiás receptorain keresztül valósul meg. Mindkét hatóanyag esetén ismertek a farmakológiai célponttól eltérő egyéb targetek, melyekhez különböző affinitással képesek kapcsolódni. Ezek a PDGFRA, PDGFRB, c-KIT, c-fms, M-CSF, DDR1, DDR2, CSF1R és SCF, melyek közvetítésével a direkt csonthatás érvényesülhet. A tapasztalt hatás függ az alkalmazott hatóanyag-koncentrációtól, a sejtek érettségi állapotától, illetve az általa kötött receptor tirozin-kináz útvonalak megoszlási arányától [3, 44-46].

Az imatinib és nilotinib csontképző oszteoblaszt és csontbontó oszteoklaszt sejtekre gyakorolt hatását immortalizált sejtvonalakon és rágcsáló modelleken tesztelték. Az *in vitro* kísérletek megfigyelései alapján, az imatinib támogatja az oszteoblaszt sejtek differenciálódását [3, 11, 47], azonban gátolja proliferációjukat és túlélésüket [4, 10, 11, 47-49]. Emellett, csökkent a oszteoklasztogenezis és a csontreszorpció mértékét, valamint az oszteoklaszt prekursorok és az érett oszteoklasztok túlélését [3, 4, 10, 47, 48]. További tanulmányokban az imatinib hatására megnövekedett oszteoblaszt specifikus génexpressziót, sejtaktivitást és mineralizációt tapasztaltak [3, 4, 10, 11, 44, 47-49].

Az imatinib dózisfüggő módon (0,05–1 μ M) indukálta a csontszövet képződését patkány és egér (MC3T3-E1) oszteoblaszt sejtvonalakon. Mindezeket, alkalikus foszfatáz (*ALP*), csont szialoprotein (*BSP*) és oszteokalcin (*BGLAP*) specifikus kvantitatív génexpressziós vizsgálatokkal is megerősítették. Az imatinib oszteoblaszt proliferációt gátló hatását több

modellben, így humán oszteoszarkóma sejtvonalon (SaOS-2), valamint egér ST2 csontvelői sztróma sejt kultúrán is leírták. Az imatinib közvetve, vagy a csontbontó sejt előalakokra hatva közvetlenül is képes gátolni az oszteoklasztogenezist [44].

Az imatinibhez hasonlóan a nilotinib (0,01-1 μ M koncentrációban) is gátolta az oszteoblaszt proliferációt. Azonban az oszteoblaszt differenciálódást csökkentette vagy nem volt rá hatással. Az oszteoblaszt sejtek nilotinib kezelése növelte az *OPG* expresszióját és szekrécióját, valamint csökkentette a *RANKL* mRNS-ének átíródását [11]. Az oszteoklasztogenezist szintén hatékonyan gátolta [44].

2.4.4. A tirozin-kináz gátló imatinib és nilotinib csontanyagcserét érintő, humán klinikai megfigyeléseinek irodalmi összefoglalása

Krónikus fázisú CML betegek aspirációs csontvelő mintáin végzett microarray vizsgálatok alapján, az imatinib (400mg/nap) a kezelés kezdeti időszakában nagymértékben befolyásolta a csontvelői hematopoietikus sejtek génexpressziós profilját. A bekövetkező transzkripciós változások szignifikánsan módosították a sejtciklust, a sejtnövekedést, a proliferációt, a DNS replikációt és rekombinációt, valamint a DNS javító mechanizmusokat [44, 45].

Magas dózisú imatinib terápia (600mg/nap) során a betegek csontbiopszia mintáinak mikro-komputer tomográfiás feltárásánál igazolták, hogy oszteopéniás CML-es betegeknél megnövekedett a csípőcsont szivacsos állománya [1]. Szivacsos csontállomány-növekedést 50 év feletti, oszteoporotikus kezelték esetén is tapasztaltak [4]. Ezzel szemben, több, terápia alatt álló betegnél mérték a csont ásványanyag-tartalom csökkenését a combnyak területén. A csontmarkerek szérumszintjének vizsgálatai alapján a csontbontó oszteoklaszt sejtek számának és aktivitásának csökkenését figyelték meg. Jelentős csökkenést figyeltek meg például a szérum CTX-1 mennyiségében, ami csökkent oszteoklaszt aktivitásra utal [1, 11]. De ezt a csökkenést a csontépítő oszteoblaszt sejtek aktivitása nem követte, és az erre vonatkozó klinikai megfigyelések egymásnak ellentmondóak voltak [1, 2, 5, 50]. A tirozin-kináz gátlókkal kezelt betegeknél hipofoszfatémia [4, 5, 9, 11, 50, 51], hipokalcémia [5, 9, 50, 51], valamint hiperparatireózis [5, 9, 50, 51] lépett fel [44].

Kezdetben számos kutatócsoport jutott olyan eredményre, hogy az onkohematológiai betegségek kezelésében elterjedten használt tirozin-kináz gátlók, mint például az imatinib és a nilotinib, pozitív csontanyagcsere változásokat idézhetnek elő. A későbbi

kiterjedtebb vizsgálatok azonban már nem minden esetben erősítették meg ezeket a megfigyeléseket. Sőt arról is beszámoltak, hogy imatinib hatására az oszteoblasztok aktivitását jelző szérumszteokalcin szint [1, 5, 50, 52], valamint a csont ásványianyagtartalom egyaránt csökken. Mivel a tirozin-kináz gátlókkal végzett kezelések egyre több beteget érintenek, illetve hosszú évtizedekig, vagy akár élethosszig is tarthatnak, indokolt ezen mechanizmusok molekuláris hátterének jobb megismerése [44].

A vizsgált két tirozin-kináz gátló főbb tulajdonságainak és a csontanyagcserére való hatásainak összefoglalása a 2. táblázatban látható.

2. táblázat A vizsgált két tirozin-kináz gátló főbb tulajdonságainak és a csontanyagcserére való hatásainak összefoglalása. A nyilak a változások irányát jelölik. ↑: az adott tulajdonság vagy folyamat fokozódása, aktiválódása. ↓: az adott tulajdonság vagy folyamat csökkenése, gátlása [44].

Hatóanyag neve	Imatinib	Nilotinib
Gyógyszer (gyártó)	Glivec / Gleevec (Novartis)	Tasigna (Novartis)
Terápiás javallat	gyermek és felnőtt CML betegek, valamint felnőtt GIST betegek és PDGFR génátrendeződéssel járó betegségek kezelésére	felnőtt krónikus fázisú CML betegek kezelésére
Alkalmazott dózis felnőttknél	400 mg/ nap, 600 mg / nap vagy 2x400 mg/nap	2x300 mg / nap vagy 1x400 mg / nap
Hatóanyag célpont	BCR-ABL onkoprotein, tirozin-kináz aktivitásának gátlása	BCR-ABL onkoprotein, tirozin-kináz aktivitásának gátlása
A célzott farmakológiai célponttól eltérő, egyéb szubsztrátok	KIT, SCF, DDR1, DDR2, CSF1R, PDGFR, c-fms, karbonikus-anhidráz II	PDGFR, KIT, Efrin-receptor
Oszteoblaszt sejtekre gyakorolt hatás	proliferáció↓, differenciálódás↑, sejtaktivitás↑, oszteoblaszt specifikus génexpresszió↑	proliferáció↓, differenciálódás↓, OPG expresszió és szekréció↑, RANKL expresszió↓
Oszteoklaszt sejtekre gyakorolt hatás	csontreszorpciós sejtaktivitás↓, oszteoklaszt prekursorok és érett oszteoklasztok túlélése↓, differenciálódás↓, aktivitás↓, oszteoklasztogenezis↓, sejtszám↓	képződés↓, aktivitás↓, differenciálódás↓, apoptózis↑, sejtszám↓
Klinikai megfigyelések a csontanyagcsere vonatkozásában	hipofoszfatémia, hipokalcémia, hiperparatireózis, csont specifikus szérumszintek változása, megnövekedett csontmineralizáció, szívacsos csontállomány növekedése, a csont ásványianyagtartalmának növekedése,	

3. Célkitűzések

A tirozin-kináz gátlók szakirodalomban ismertetett, csont-anyagcserére gyakorolt jelentős hatásai miatt, jelen dolgozatban, két tirozin-kináz gátló hatóanyag példáján keresztül vizsgáljuk meg az oszteoblaszt sejtek jelátviteli útvonalaiiban valamint a génexpresszióiban végbemenő változásokat. Mivel a csontanyagcserében fontos jelátviteli útvonalak működésének részleteit sikerült tisztázni Horváth Péterrel közös munkánk során, feltételezzük, hogy az ott azonosított és a vizsgálat során a csontanyagcserében legmeghatározóbb szerepet betöltő Wnt jelátvitel, a tirozin-kináz gátlók csonthatásaiban is érvényesül.

Mivel az egér tirozin-kináz gének ortológjait, majdnem minden emberi tirozin-kináz génnél azonosítani lehet [14], vagyis majdnem minden tirozin-kináz gén a két faj közös ősenek ősgénjeiből származtatható, és mindkét fajban ugyan azt a szerepet tölti be, ezért a vizsgálatokra való felkészülés során, az imatinibbel és nilotinibbel tervezett in vitro teljes transzkriptóma vizsgálatainkhoz, az MC3T3-E1 egér oszteoblaszt sejt kultúrákat alkalmasnak találtuk. Így, munkánk során az imatinibbel és nilotinibbel tervezett in vitro vizsgálatokat oszteoblaszt MC3T3-E1 sejt kultúrákon végezzük.

A kutatás során különböző vegyület-koncentráció és expozíciós idők tanulmányozása után egy optimális kezelési beállítást követően, a feladat, a teljes RNS izolálása kezelt és kezeletlen sejt vonalakból egyaránt, majd cDNS átfordítás után újgenerációs szekvenátor rendszert felhasználva teljes transzkriptóma analízis (WTA). Teljes transzkriptóma analízis (WTA) segítségével meghatározhatóak azok a géncsoportok, melyek a használt tirozin-kináz inhibitorok hatására a csontsejtekben eltérő módon expresszálódnak. Ezekből a génekből statisztikai elemzéseket követően jelátviteli útvonal analízissel feltérképezzük, a tirozin-kináz gátló kezelések hatására legjelentősebben változott jelátviteli útvonalakat. A szakirodalomban megjelent korábbi vizsgálatoknál a csontokhoz szorosan kötődő gének expresszióját vizsgálták már, de a tirozin-kináz gátlók csonthatásaival kapcsolatban, ilyen mélységű molekuláris biológiai sejt szintű feltárást még nem végeztek előttünk. Így a tirozin-kináz gátlók oszteoblaszt sejtek génexpressziójára gyakorolt hatását, a mintákban jelen lévő összes mRNS azonosítását követően elsőként tanulmányozhatjuk. Kutatásunk célja, hogy megvizsgáljuk az imatinib és a BCR-ABL gátlásra szelektívebb nilotinib egér oszteoblaszt sejtek génkifejeződéseire kifejtett hatásait a teljes transzkriptom szintjén in vitro rendszerben. Valamint, hogy

feltérképezzük a kezelés hatására a sejten belül megváltozott jelátviteli és szabályozó útvonalakat.

Kitűzött feladatok:

- A csontbetegségekkel kapcsolatba hozható ismert jelátviteli útvonalak tanulmányozása, mélyebb megismerése. Mivel a Wnt útvonal csontanyagcserében betöltött fontos szerepét, Horváth Péterrel közös munkánk eredményeként mi is megerősítettük már korábban, ezért ennek az útvonalnak a tirozin-kináz gátlók csonthatásában betöltött szerepének vizsgálatára kiemelt figyelmet fordítunk.
- A megfelelő koncentráció és inkubálási idő megválasztását követően, az imatinib és a nilotinib MC3T3-E1 egér oszteoblaszt sejtek génexpressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata, új generációs szekvenáláson alapuló teljes transzkriptóma analízis segítségével.
- Mindkét hatóanyag esetében, a szekvenálással azonosított gének statisztikai elemzését követően, a szignifikáns expresszió változást mutató gének meghatározása.
- A szignifikáns génekből, Ingenuity Pathway Analysis 7.6 szoftver (QIAGEN) segítségével a top útvonalak, a top upstream regulatorok és a top molekulák azonosítása.
- Megvizsgálni, hogy az azonosított változások, miként támaszthatják alá a korábbi klinikai megfigyeléseket.
- Az eredmények tükrében megvizsgálni, hogy az imatinib és a nilotinib oszteoblaszt génexpresszióra gyakorolt hatása megegyezik-e?

4. Módszerek

4.1. MC3T3-E1 oszteoblaszt sejtek in vitro tenyésztése

A vizsgált MC3T3-E1 egér preoszteoblaszt sejteket az ATCC-től (Rockville, MD, Amerikai Egyesült Államok) vásároltuk, és felhasználásukig folyékony nitrogénben tároltuk. 2*1,5 ml sejtet 20 ml Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification (α -MEME, Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) sejttenyésztő médiumban tartottuk, kiegészítve 0.292 g/L L-glutaminnal (Sigma), és 5% magzati borjú szérummal (FCS, Sigma), valamint 1% (200 μ l) antibiotikummal (penicillin-streptomycin szulfát-amphotericin B (Sigma)), hogy biztosítsuk a sejtek számára megfelelő fizikai és kémiai környezetet, szükséges tápanyagokat és növekedési faktorokat. Inkubátorral (Nuaire US autoflow CO₂ Water-jacketed Incubator, Nuaire, Plymouth, MN, Amerikai Egyesült Államok) 37°C-on, 5% CO₂ tartalom és 78% páratartalom mellett tartottuk a sejteket.

A sejttenyésztő médiumot hetente kétszer cseréltük. Az inkubátorból kivett falskán mikroszkóp alatt jól látható, hosszú, tüskés kinézetű sejtek fejlődtek. Az MC3T3-E1 egér preoszteoblaszt sejtek átoltása 70%-os konfluencia esetén történt. Az átoltások során, a tápoldatot leöntöttük a sejtekről. Ezt követően a flaska falára letapadt sejtek feloldására 0,25% (5 ml) Trypsin EDTA oldatot (Sigma) használtunk. Az inkubátorból kivéve, mikroszkóp alatt ellenőriztük a sejtek leoldódását a flaska faláról, miután minden sejt újra gömböc alakot vett fel és szabadon mozogtak a megmozdított flaska folyadékában, akkor hozzáadtunk 15ml médiumot. Az oldat homogenizálását követően egy centrifuga csőbe átpipettázzuk a már 20 ml oldatot. A centrifugálást (Beckman Coulter Allegra x-22R centrifuge, Beckman Coulter, Brea, Ca, Amerikai Egyesült Államok) 5 percig, 2000 rpm-mel (revolution per minute= fordulat per perc), 22°C-on, 8 szoros gyorsítás és lassítás mellett végeztük el. A centrifugálás végén a felülúszót óvatosan eltávolítottuk. A centrifugacső alján maradt sejteket 10 ml médiumban felfuszpendáltuk. Ebből a frissen felkevert mintából 1 ml-t mértünk át egy új inkubált friss tápoldatot tartalmazó flaskába, és újra inkubátorba tettük a sejteket. A sejt kultúrákkal végzett kísérleteket 8-15 átoltás között végeztük el.

Minden felhasznált vegyszer analitikai minőségű volt, valamint a sejttenyésztés preparatív munkafolyamatait 70%-os etanol oldattal fertőtlenített sterilizáló fülkében

(Nuair Biological Safety Cabinets) végeztük. A labor sterilitását, légterének fertőtlenítettségét UV-C sugárzást kibocsájtó germicid lámpa biztosította.

4.2. In vitro vizsgálatok imatinibbel és nilotinibbel

4.2.1. Sejtéletképesség mérés

Az in vitro vizsgálatokhoz három csoportot alakítottunk ki: imatinibbel kezelt csoportot, nilotinibbel kezelt csoportot és egy kezeletlen kontroll csoportot. Minden esetben 3 párhuzamos mérést végeztünk. Először különböző imatinib (Glivec®/ Gleevec®, STI571, CGP 57148B ; Novartis, Basel, Svájc) és nilotinib (Tasigna, Novartis) koncentráció (30nM-20µM) mellett, különböző inkubációs időket alkalmazva vizsgáltuk a sejtek túlélését 96 lyukú sejttenyésztő lemezekben. A kísérletek során igyekeztünk az *in vitro* kultúrák esetén elérhető leghosszabb kezelést alkalmazni. A tápoldat eltávolítása után 100 µl/well triklór ecetsavval (Sigma) fixáltuk a sejteket a 30 perces inkubálási periódus alatt. Ezt követően a sejttenyésztő lemezeket ötször átöblítettük desztillált vízzel. A sejteket 100µl 4%-os szulfuródamin-B (SRB, Sigma) protein festék oldattal festettük meg 1%-os ecetsavas közegben. Az inkubálási idő 30 perc volt. A felesleges festék oldat eltávolítása után a sejttenyésztő lemezeket négyszer átöblítettük 1%-os ecetsav oldattal, ezt követően szobahőmérsékleten hagytuk megszáradni. A kötött SRB-t 100µl 10mM-os Tris-mal (Sigma) feloldottuk és a sejttenyésztő lemezeket 5 percig rázogattuk. A méréseket Multiskan Spectrum V1.2 1500-636 készülékkel (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham MA, Amerikai Egyesült Államok), SkanIt Software 2.4.2 RE for Multiskan Spectrum szoftverrel, 520 nm-en, 96 lyukú Thermo Cliniplateken (Thermo Fisher Scientific Inc) végeztük.

4.2.2. PCR vizsgálatok

A sejtéletképesség mérésekkel párhuzamosan a különböző hatóanyag-koncentrációk és inkubálási időök oszteoblaszt sejtekre gyakorolt hatásait relatív kvantifikációs valós idejű polimeráz-láncreakciós (RT-PCR) módszerrel is megvizsgáltuk. Az adott koncentráció és inkubációs idő mellett, a sejtekből RNS-t izoláltunk, Roche RNS izoláló protokoll szerint (High Pure Total RNA Isolation kit, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, Amerikai Egyesült Államok). Az izolált RNS-ek, cDNS-re fordítását követően RT-PCR

segítségével határoztuk meg a kezelések hatására megfigyelhető, csont specifikus génexpressziós változások (például: ALP, RANK, RANKL, OPG, BMP4, BMP2, BMP8A, Col1A1, MMP2). A relatív kvantifikációs RT-PCR adatok normálásához használt endogen kontroll a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) volt.

4.2.3. A megfelelő hatóanyag-koncentráció kiválasztása

Az eredmények alapján meghatároztuk a megfelelő inkubálási időt és hatóanyag-koncentrációt. A további *in vitro* vizsgálatoknál a sejteket 24 lyukú lemezen 1 μ M-os hatóanyag koncentráció mellett 6 napig kezeltük. A 6 napos inkubációs idővel az imatinib és nilotinib kezelések hosszabb távú hatását tudtuk vizsgálni *in vitro* sejtes rendszerben.

4.2.4. Imatinibbel és nilotinibbel történő kezelések

A bemutatott eredmények elsősorban nem a gyors, hanem a lassabban kialakuló másodlagos génaktivitásokban bekövetkező változásokat tükrözik. Ezt azért tartottuk fontosnak, mert a vizsgált két tirozin-kináz gátló hatóanyag terápiás alkalmazása évtizedekig vagy akár élethosszig is tarthat.

4.3. RNS izolálás

A teljes transzkriptóma analízishez a kezelt és kezeletlen oszteoblaszt sejtekből RNS-t izoláltunk. Az RNS izolálást High Pure Total RNA Isolation System (Roche, Indianapolis, IN, Amerikai Egyesült Államok) segítségével hajtottuk végre. A gyártó utasításai szerint a következő lépéseket hajtottuk végre. A sejteket 200 μ l PBS (phosphate buffered saline) oldatban felfuszpendáltuk. Hozzáadtunk 400 μ l lysis/- binding puffert és 15 másodpercig vortexeltük. Ezt követően a minta teljes mennyiségét átpipettáztuk és lecentrifugáltuk (15 másodperc, 8000xg). Minden mintához 100 μ l DNáz oldatot (90 μ l DNáz inkubációs puffert és 10 μ l DNáz I oldatot) adtunk és 15 percig szobahőmérsékleten (15-25°C) inkubáltuk. Inkubálás után hozzáadtunk minden mintához 500 μ l mosó puffert, amit egy újabb centrifugázási lépés (15 másodperc, 8000xg) követett. Ezt követően még egyszer átmossuk a mintákat, 500 μ l mosó pufferrel, de most egy másik mosó puffert használva, és újra lecentrifugáltuk (15 másodperc, 8000xg) a mintákat. Ezt követően 200 μ l mosó pufferrel mossuk át a mintákat, és ehhez a mosási

lépéshez tartozó centrifugálást 2 percig maximális sebességen (15000xg) végeztük. Az RNS-ek eluálásához 100 µl eluáló pufferrel centrifugáltuk (1 perc, 8000xg) a mintákat. Az izolált RNS minőségét Bioanalyzeren (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Amerikai Egyesült Államok), mennyiségét Qubit fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, Amerikai Egyesült Államok) segítségével mértük meg. Ezt követően a párhuzamos biológiai minták poolozása után a teljes transzkriptóma analízis kivitelezését a kezelt és kezeletlen sejtvonalakból Applied Biosystems SOLiD™ V4 készüléken (Life Technologies) végeztük el.

4.4. SOLiD újgenerációs RNS szekvenálás (Teljes Transzkriptóma Analízis)

Az RNS szekvenáláson alapuló teljes transzkriptóma analízissel (WTA) viszonylag olcsón és gyorsan meghatározhatóak egy adott minta transzkriptómájában lévő kódoló és nem kódoló RNS-ek. Ezáltal a WTA alkalmas a genomszintű génexpressziós változások kvantitatív detektálására. Az így kinyerhető óriási adathalmazok precíz kiértékelését korszerű bioinformatikai szoftverek teszik lehetővé.

Mivel az RNS szekvenálás (RNA sequencing (RNA-Seq)) sikerességét a kiinduló RNS minta minősége nagymértékben meghatározza, ezért a Bioanalyser készülékkel mért, a totál RNS molekulák minőségére utaló, RNS integritás szám (RIN, RNA integrity number) értékét 1-től 10-es skálán, 8 felett tekintettük megfelelőnek, ahol a 10 a magas minőségű intakt RNS-t jelöli. A megfelelő minőségű totál RNS mintákból, a könyvtárkészítés előtt, DNase kezeléssel biztosítottuk a minták DNS mentességét, valamint a riboszómális RNS-ek (rRNS) is eltávolításra kerültek egy rRNS molekulára szelektív hibridizációs módszerrel (RiboMinus™ Eukaryote Kit for RNA-seq, Thermo Fisher Scientific Inc). Ennél a tisztítási lépésnél felhasznált vegyszereket és azok mennyiségét a 3. és 4. táblázat tartalmazza.

3. táblázat DNáz kezelésnél felhasznált vegyszerek és azok mennyisége. Az elkészült elegyeket 37°C-on 30 percig inkubáltuk.

Hozzáadott anyag megnevezése	Kontroll csoportnál felhasznált mennyiség (μl)	Imatinibbel kezelt csoportnál felhasznált mennyiség (μl)	Nilotinibbel kezelt csoportnál felhasznált mennyiség (μl)
Minta	62	54	58
10x DNáz puffer	10	10	10
DNáz (2U/μl)	1,5	1,5	1,5
RNáz out	1	1	1
Nukleáz-mentes víz	25,5	33,5	29,5
Teljes mennyiség	100	100	100

4. táblázat rRNS eltávolításánál felhasznált vegyszerek és azok mennyisége.

Hozzáadott anyag megnevezése	Kontroll csoportnál felhasznált mennyiség (μl)	Imatinibbel kezelt csoportnál felhasznált mennyiség (μl)	Nilotinibbel kezelt csoportnál felhasznált mennyiség (μl)
Total RNS	20	20	20
RiboMinus Próba	10	10	10
Hibridizációs puffer	300	300	300
Teljes mennyiség	330	330	330

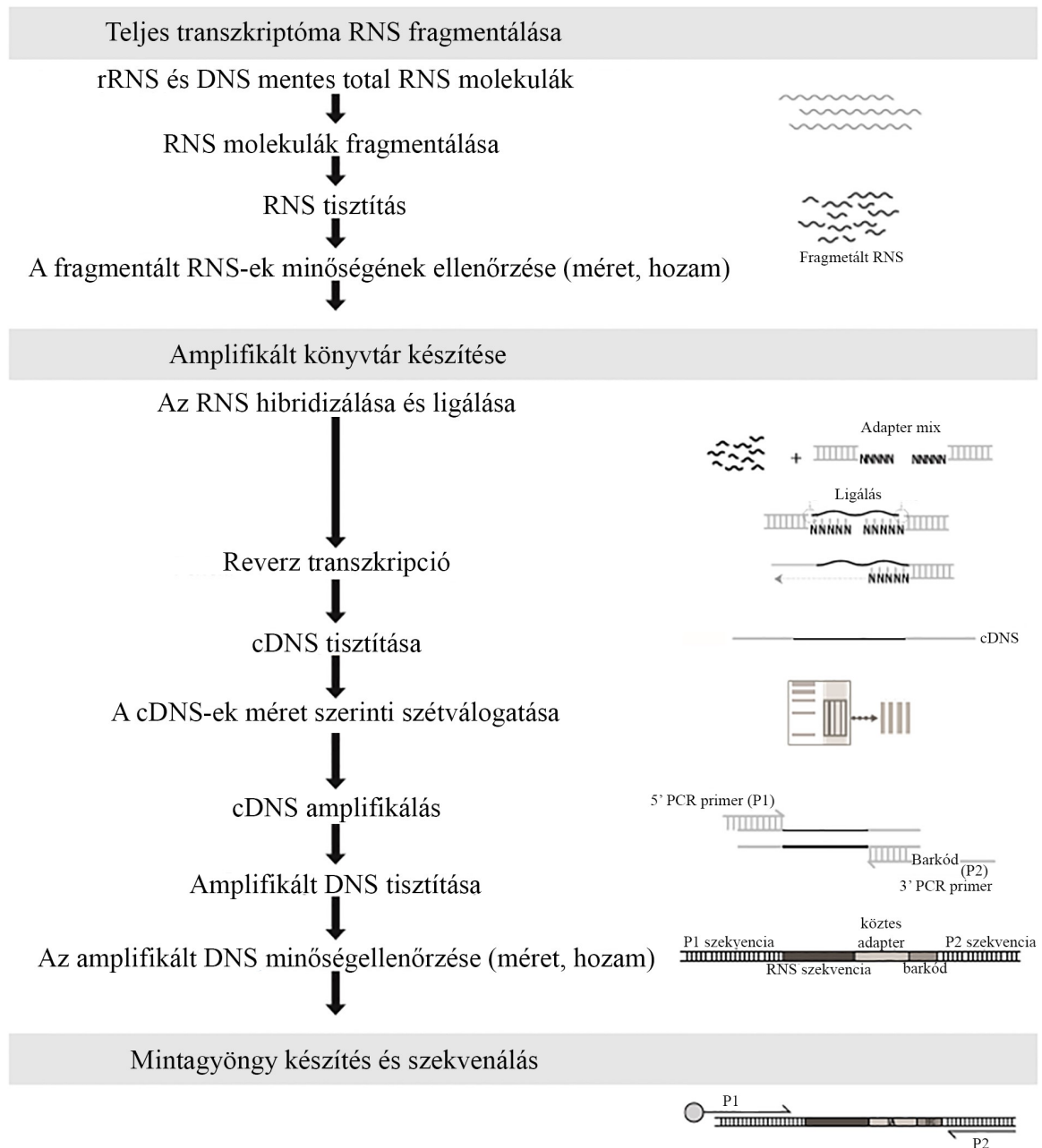
A tisztított, DNS mentes totál RNS molekulák (>5 μg/minta, RIN>8.0, cc>400ng/μl) új generációs vizsgálatán alapuló teljes transzkriptóma analízisét, SOLiD™ V4 (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection, Life Technologies) új generációs technológiával, a fragmensek mindkét végét is leolvasó paired end könyvtár típussal, 50*25bp olvasási hosszal a SeqOmics Biotechnológiai Kft. (SeqOmics Biotechnológiai Kft. Szeged, Magyarország, <http://www.seqomics.hu/>) végezte.

4.4.1. Teljes transzkriptóma analízis

A teljes transzkriptóma analízis kivitelezését a gyártó által megadott teljes transzkriptóma analízis kézikönyv (SOLiD™ Whole Transcriptome Analysis Kit, 4409491, Life Technologies – Applied Biosystems) utasításai szerint végeztük [8. ábra].

A szekvenálás előkészítésének első fő lépése a tisztított, rRNS és DNS mentes totál RNS molekulák fragmentálása. Ezután következtek a tisztítási és minőség ellenőrzési lépések. Ezt követően a második fő lépés az RNS fragmensekből amplifikált könyvtár létrehozása volt. Ebben a lépésben a fragmensek két végére különböző adapter molekulákat kötnek,

kovalens kötés kialakulását katalizáló ligáz enzimek segítségével. Továbbá ez a lépés tartalmazta a reverz transzkripciót, a cDNS tisztítását, minőségi ellenőrzését, amplifikálását, valamint egy újabb tisztítási és minőség ellenőrzési lépést.



8. ábra WTA folyamatára.

4.4.2. Mintagyöngy készítés

Az átfordítás után minta gyöngyöt készítettünk a gyártó utasításai szerint (SOLiD™ 4 System Templated Bead Preparation Guide, 4448378, Life Technologies - Applied Biosystems). A minta könyvtárakat SOLiD P1 DNA gyöngyökön emulziós PCR segítségével amplifikáltuk.

Minden PCR mikro reaktor vízcseppben ideális esetben van egy gyöngy, templát, DNS-polimeráz enzim és primerek. Az adapter molekulákat tartalmazó DNS szálak, a mágneses gyöngyökön lévő komplementer primerekhez kapcsolódnak. Minden gyöngyhez egyféle DNS darab kapcsolódik. A gyöngy és a minta kapcsolódása után, megszintetizálódik a másik szál is, ezt követően a templát denaturálódik, a mintaszál leválik és a gyöngy felszínén az újonnan szintetizálódott egy szál marad. A reakció ismétlésével a gyöngyön lévő mintaszálak megsokszorozódnak. Az emulziós PCR reakció után az emulzióban lévő mikro reaktorok 2-butanollal feltörhetőek és a mintagyöngyök mosással kinyerhetőek. Ezután következett a feldúsított mintagyöngyök mennyiségének és minőségének meghatározása. Végül a 3' vég módosításával a gyöngyök szekvenáló lemezhez rögzíthetőek, és bekerülnek a szekvenátorba. A szekvenciák meghatározását SOLiD™ 4 újgenerációs szekvenátor rendszert felhasználva, négyféle flouorforral jelölt oktamer oligók ligálásával végeztük el.

4.4.3. SOLiD újgenerációs szekvenálás

Az Applied Biosystems SOLiD™ V4 újgenerációs szekvenátor rendszer, oligonukleotid ligáláson és detektáláson alapuló szekvenálást tesz lehetővé. Az alkalmazott 8 nukleotidból felépülő oligonukleotidok általános szerkezetére jellemző, hogy a 3' végtől számozva, az első két nukleotid (16 féle kombinációval) a szekvenálandó templát szál specifikus komplementerei, a harmadik, negyedik és ötödik helyen degenerált, azaz bármilyen bázissal kötődni képes nukleotidok foglalnak helyet, míg a hatodik, hetedik és nyolcadik helyen univerzális nukleotidok találhatóak. A próbák 3' végén hidroxil csoport, az ötödik és hatodik nukleotid között hasító hely (beépülést követően itt hasad el), valamint az 5' végen négy féle (piros, kék, sárga, zöld) fluoreszcens festék jelölés található. A ligációs ciklusok után, amikor a templát szál teljes hosszához specifikus próbák kapcsolódnak, az újonnan szintetizált szálát eltávolítják, és a mintaszál visszaállítása után, új primerrel az adapteren egy pozícióval eltolva (n-1, n-2, n-3, n-4),

teljesen előlről újra kezdődnek a ligációs ciklusok. Összesen, öt teljes ligációs ciklus megismétlésével, a templát szál összes bázisa megismerhető, úgy hogy minden bázist kétszer olvasott le a rendszer.

Az Applied BiosystemsTM Next-Generation Sequencing Data Analysis szoftver csomag (készülék kezelés, adatelemzés, vizualizáció) használatával állítottuk be a szekvenálási beállításokat, értékeltük az adatokat. Az új generációs szekvenálási folyamat előkészítését a gyártók utasítási szerint végeztük (SOLiDTM 4 System Instrument Operation Guide, 4448379, Life Technologies - Applied Biosystems). A készülék előkészítése után a szekvenálási folyamat szoftveres beállításaihoz, elindításához, valós idejű nyomon követéséhez, és az eredmények elemzéséhez a gyártók által ajánlott Instrument Control Software (ICS), SOLiD Experimental Tracking System (SETS), BioScope szoftvereket használtuk. A folyamat során a megfelelő kézikönyv használatával végig betartottuk a szoftverek használatára vonatkozó gyártói utasításokat. A szekvenálást követően, az RNS szekvenálási adatokból az expresszió kiszámítása CLC Genomics Workbench 4.0.2 szoftverrel (QIAGEN, Redwood City, CA, Amerikai Egyesült Államok, www.qiagenbioinformatics.com) valósult meg.

4.5. Génexpressziós változások statisztikai elemzése

A génexpressziós eredmények kiértékelése során alkalmazott statisztikai számításokkal a következő kérdésekre kerestük a választ. Az első, hogy a kezelések hatására történt-e szignifikáns változás az oszteoblaszt sejtek génexpressziójában, és ha igen, vajon megegyezik-e a vizsgált két hatóanyag génexpresszióra gyakorolt hatása vagy nem? Második fő kérdés, az volt, hogy melyek azok a gének, amik a leginkább változtak a kezelés hatására?

4.5.1. Egymintás t teszt

A paraméteres eljárások csoportjába tartozó, egymintás t teszt módszerrel vizsgálható, hogy egy minta várható értéke, eltér-e egy feltételezett várható értéktől vagy megegyezik azzal. Génexpressziós adattáblázataink alapján, a kezelések hatására bekövetkezett változások azonosításához a logFC értékeket választottuk vizsgálandó valószínűségi változónak az egymintás t tesztek elvégzéséhez. A tesztek futtatása előtt ellenőriztük, hogy a választott valószínűségi változó megfelel-e a kritériumoknak.

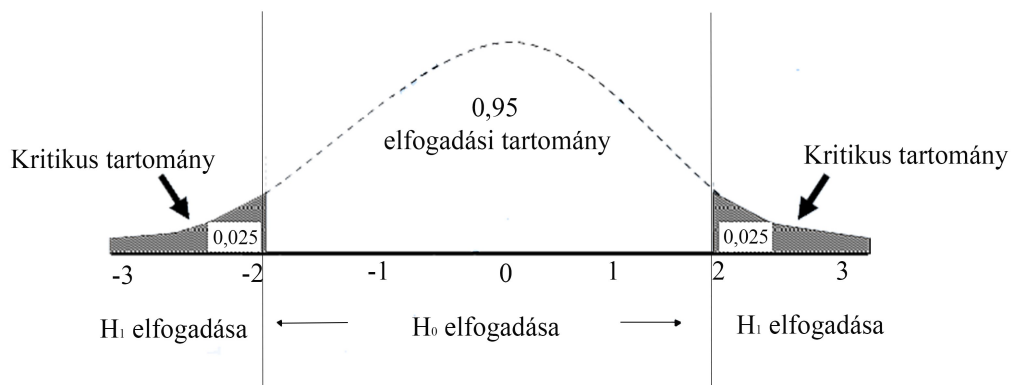
A teszt alkalmazásának feltétele, hogy a vizsgált valószínűségi változó eloszlása normális eloszlású legyen, és intervallum vagy arányskálán értelmezhető legyen.

Az egymintás t-teszt statisztikai számításainak elvégzéséhez az R Core Team (2015) (R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria, <https://www.R-project.org/>) programnyelvet használtuk.

A kezelések hatására tapasztalt génexpressziós változások igazolására, a következő hipotéziseket fogalmaztuk meg:

- H_0 (null hipotézis) \rightarrow $\text{átlag}(\log FC) = 0$, nem történt expressziós változás
- H_1 (alternatív hipotézis) \rightarrow $\text{átlag}(\log FC) \neq 0$, expressziós változás történt

Hipotézis vizsgálataink során, két oldali próbát alkalmaztunk, tehát a feltételtől való eltérést vizsgáltuk, de az irányát nem, hogy a csökkenésről és a növekedésről egyaránt kaphassunk információt. A hipotézisek elfogadási döntéseit 9. ábra szemlélteti.



9. ábra Kétoldalú hipotézis vizsgálat döntési ábra

A p-értékre vonatkozóan a következő megfogalmazásokat tettük:

- Ha a $p < 0,05$, H_0 -t elvetjük, H_1 -t elfogadjuk
- Ha a $p \geq 0,05$, H_0 -t elfogadjuk.

A döntés meghozása a számított t érték alapján:

Ha a számított t érték abszolút értéke nagyobb a táblázatból kiolvasott kritikus értéknél, akkor az alternatív hipotézist fogadjuk el. Ellenkező esetben a null hipotézist fogadjuk el.

$$t = \frac{\bar{X} - m}{S(\bar{X})}$$

1. egyenlet A t próbastatisztika értékének kiszámítása, ahol \bar{X} a vizsgált valószínűségi változó átlaga a mintában, m egy előre meghatározott érték, melyhez az átlagot viszonyítjuk, $S(\bar{X})$ a vizsgált valószínűségi változó átlagának szórása.

4.5.2. Szignifikáns gének kiválasztása

Mindkét hatóanyag esetében az expresszáldott gének p-értékei alapján meghatároztuk a szignifikáns változást mutató géneket Benjamini and Hochberg False Discovery Rate számítás segítségével. A statisztikailag szignifikáns változást $P \leq 0,05$ érték esetén fogadtuk el.

A géneket p-értékük alapján sorba rendezzük a legkisebbtől a legnagyobbig. A legnagyobb p értéket változatlanul hagytuk, a második legnagyobb p értéket megszoroztuk a génlista génjeinek számával és elosztottuk a sorszámmal. A szignifikancia szint, 0,05 volt, tehát a $P \leq 0,05$ teljesülés esetén az adott gént szignifikánsnak értékeltük [2. és 3. egyenlet]. Ez a viszonylag gyenge módszer, több hibás pozitív minősítést eredményez, és kevesebb hibás negatív minősítést. Ez a korrekció a p-érték csökkenésével egyre szigorúbbá válik.

$$\text{korrigált } (p - \text{érték}) = (p - \text{érték}) * \left(\frac{\text{a listában szereplő összes gén száma}}{\text{az adott gén sorszáma}} \right) \leq 0,05$$

2. egyenlet: Benjamini and Hochberg False Discovery Rate számítási módszere. Ha ez a feltétel teljesül, a gén szignifikáns.

$$\text{korrigált } (p - \text{érték}) = (p - \text{érték}) * \left(\frac{n}{n-1} \right) \leq 0,05 \text{ , a gén szignifikáns}$$

A második gén korrigált p-értékének kiszámítása a fenti képlet alapján.

$$\text{korrigált } (p - \text{érték}) = (p - \text{érték}) * \left(\frac{n}{n-2} \right) \leq 0,05 \text{ , a gén szignifikáns}$$

A harmadik gén korrigált p-értékének kiszámítása a fenti képlet alapján.

3. egyenlet: Példa a második és a harmadik gén korrigált p-értékének kiszámítására.

4.5.3. Jelátviteli útvonal analízis

A kiválasztott szignifikáns géneket Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 7.6 szoftver (QIAGEN, Redwood City, CA, Amerikai Egyesült Államok, www.ingenuity.com) segítségével értékeltük ki. A szoftveres kanonikus útvonal elemzés során, az IPA adatbázisa alapján azonosításra kerültek azok a jelátviteli útvonalak, amik tartalmazták az általunk bevitt szignifikáns géneket. Az adataink és a kanonikus útvonalak közötti kapcsolat meghatározásához a program figyelembe vette a bevitt adataink alapján azoknak a géneknek a számát, amiket az adott útvonalhoz tudott kapcsolni, és ezt elosztotta az adott kanonikus útvonalhoz tartozó összes génszámával. Továbbá Fischer exakt teszt alapján meghatározta az adott útvonal és a bevitt gének kapcsolatához rendelhető valószínűségeket, ezzel láthatóvá téve a véletlen asszociációkat.

Az upstream regulátor elemzés meghatározta az upstream transzkripció regulátor kaszkádokat, a transzkripció regulátorok és a target génjeik közötti elvárt hatásokra vonatkozó, az Ingenuity tudásbázisban rendelkezésre álló információk alapján. Az elemzés során a program megvizsgálta, hogy a transzkripció regulátorok ismert targetjei közül, hány van jelen a bevitt adatainkban, és összehasonlította a változásaik irányát (a kontroll mintához képest, a kísérleti mintákban detektált expressziót vizsgálta), azért, hogy a szakirodalom alapján a változásokból következtetni lehessen a releváns transzkripció regulátorokra. Az átfedő p-érték célja az, hogy meghatározza, azokat a transzkripció regulátorokat, amikkel megmagyarázhatóak a megfigyelt génexpressziós változások. Az átfedő p-érték alapján meghatározható, hogy az átfedés a bevitt gének és a szakirodalom alapján a transzkripció regulátor által szabályozott gének között statisztikailag szignifikáns-e. Ez a Fischer exakt teszt alapján számolt érték szignifikánsnak tekinthető a $P < 0,01$ értékeknél.

Az kísérlet során expresszáldott gének logFC (fold-change: az expressziós változás mértéke a kezelt csoportban a kontroll csoporthoz viszonyítva) értékei alapján meghatározhatóak a legupreguláltabb molekulák.

Összességében, az IPA szoftver segítségével feltérképezésre kerültek az imatinib és nilotinib immunszuppresszív gyógyszerhatóanyagok hatására módosult jelátviteli útvonalak, top upstream regulátorok és top molekulák. A kiértékelés során, kiemelt figyelmet fordítottunk a hatóanyagok feltételezett csontanyagcsere modifikáló hatásainak értelmezésére és magyarázatára.

5. Eredmények

5.1. Az imatinibbel és a nilotinibbel végzett *in vitro* hatóanyag-koncentrációt és kezelési időt optimalizáló kísérletek eredményei

Három párhuzamos mérést végrehajtva, az imatinibbel és a nilotinibbel végzett *in vitro* kísérletek eredményei alapján meghatároztuk az *in vitro* kultúrák esetén elérhető leghosszabb kezelési időt, valamint a megfelelő hatóanyag koncentrációt.

A sejtleletkéesség mérések eredményei alapján, 1 μ M hatóanyag-koncentrációt és 6 napos inkubálást alkalmazva is elegendő sejt (SRB% > 50) maradt a további vizsgálatokhoz. Nagyobb koncentrációnál, illetve hosszabb inkubációs periódus után a sejtleletkéesség meredeken csökkent a vizsgált hatóanyagok esetén. Továbbá ezen körülmények voltak a legnagyobb hatással az oszteoblaszt sejtek csont specifikus génexpressziós profiljára is, amit a relatív kvantifikációs RT-PCR vizsgálatok segítségével detektált, megnövekedett BMP8A, Col1A1, MMP2 és OPG expresszió is megerősít.

A 6 napos inkubációs idővel az imatinib és nilotinib kezelések hosszabb távú hatását vizsgáltuk, *in vitro* sejtes rendszerben. Ezért a továbbiakban bemutatott eredmények is elsősorban a lassabban kialakuló másodlagos génaktivitásokban bekövetkező változásokat tükrözik.

5.2. Szekvenálási eredmények

A teljes transzkriptóma analízishez, az azonos minták poolozása után RNS-t izoláltunk a kezelt (imatinibbel kezelt csoport, nilotinibbel kezelt csoport) és a kezeletlen (kontroll csoport) oszteoblaszt sejtekből.

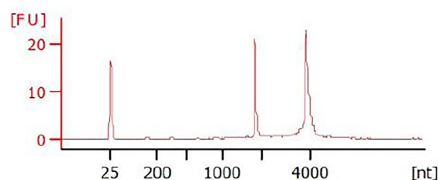
A Bioanalyser készülékkel meghatározott kiinduló RNS minták minőségére utaló mérési adatot az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat A kiinduló RNS molekulák minőségének meghatározása. A totál RNS molekulák minőségére utaló, RNS integritás szám (RIN, RNA integrity number) 1 és 10 közötti értékeket vehet fel, ahol a 10 a magas minőségű intakt RNS-t jelöli. A táblázat a kerekített értékeket tartalmazza. A mért RIN adatok alapján, mindhárom csoportban megfelelő volt az RNS minősége.

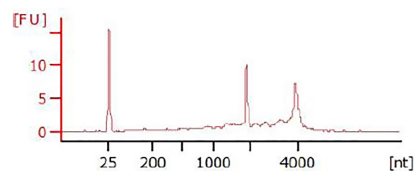
Minta	RIN
Kontroll csoportból izolált RNS	10
Imatinibbel kezelt csoportból izolált RNS	8
Nilotinibbel kezelt csoportból izolált RNS	10

Az RNS szekvenálás (RNA sequencing (RNA-Seq)), megfelelő minőségű és tisztaságú totál RNS molekulákkal lett elvégezve.

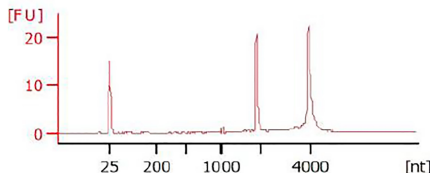
A, Kontroll csoportból izolált RNS molekulák elektroferogramja



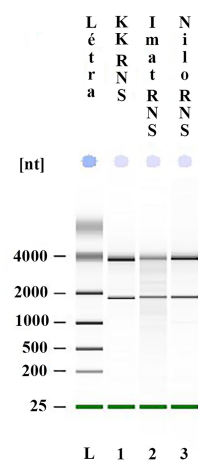
B, Imatinibbel kezelt csoportból izolált RNS molekulák elektroferogramja



C, Nilotinibbel kezelt csoportból izolált RNS molekulák elektroferogramja

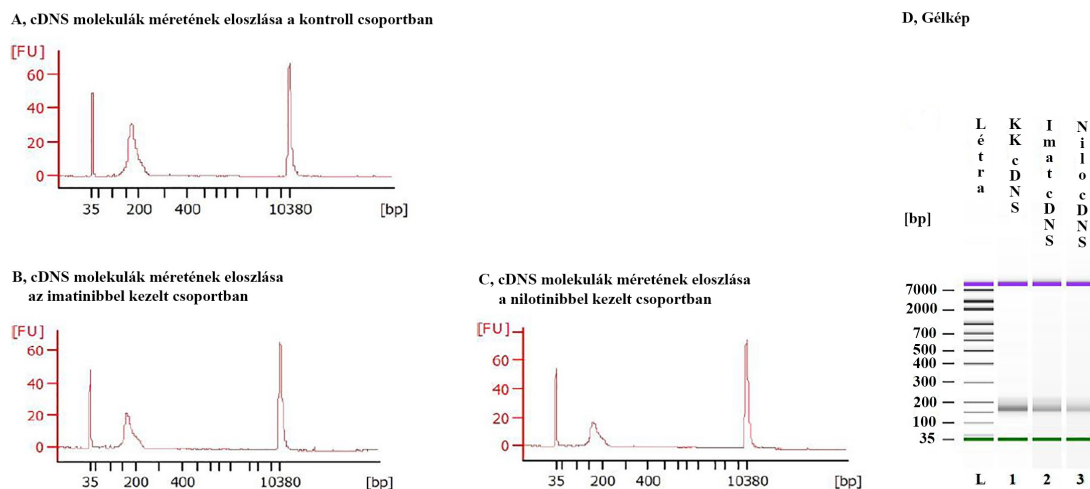


D, Gélkép



10. ábra Az izolált RNS molekulák elektroferogramja és gélképe: Mindhárom elektroferogrammon jól látható a ~25 nukleotid hosszánál jelentkező marker csúcs, illetve az ~1800 és ~4000 nukleotid hosszánál jelentkező két másik nagy intenzitású csúcs, ami az RNS molekulák méretét jelöli. Ugyan ezt az eredményt szemlélteti a gélkép is. A képek Bioanalyzer 2100 készülékbe helyezett RNA 6000 Nano Chip és Bioanalyzer 2100 Expert szoftver használatával készültek.

A megfelelő minőségű totál RNS mintákból, a könyvtárkészítés előtt a riboszómális RNS-ek (rRNS) is eltávolításra kerültek egy rRNS molekulára szelektív hibridizációs módszerrel, valamint DNase kezeléssel biztosítottuk a minták DNS mentességét. A tisztított, DNS mentes totál RNS molekulákat ezt követően fragmentáltuk, végül reverz transzkripcióval cDNS molekulákká alakítottuk.



11. ábra Az amplifikált cDNS molekulák méretének eloszlása: Mindhárom elektroferogrammon és a gélképen is jól látható, hogy a mintákban jelenlévő cDNS molekula fragmensek többsége a ~160 - ~170 bázispárt tartalmazó fragmens-tartományba esik. A képek Bioanalyzer 2100 készülékkel, Agilent High sensitivity DNA kittel és Bioanalyzer 2100 Expert szoftver használatával készültek.

A teljes transzkriptóma analízis, SOLiD™ V4 új generációs szekvenátor rendszerrel, a fragmensek mindkét végét is leolvasó paired end könyvtár típussal, 50*25bp olvasási hosszal történt. A szekvenálás leolvasási adatait a 6. 7. és a 8. táblázatban foglaltuk össze.

6. táblázat A kezeletlen kontroll csoport szekvenálásának leolvasási adatai

	Egyedileg leképezett olvasások	Frakció	Nem egyedileg leképezett olvasások	Frakció	Léképezett olvasások	Teljes leképezett olvasások %-a
Exon-exon olvasások	2.536.343	0,91	246.495	0,09	2.782.838	4,95
Exon-intron olvasások	345.800	0,95	18.703	0,05	364.503	0,65
Teljes exon olvasások	16.260.651	0,90	1.792.277	0,10	18.052.928	32,14
Teljes intron olvasások	33.737.870	0,88	4.385.352	0,12	38.123.222	67,86
Teljes gén olvasások	49.998.521	0,89	6.177.629	0,11	56.176.150	100,00

7. táblázat Az imatinibbel kezelt csoport szekvenálásának leolvasási adatai

	Egyedileg leképezett olvasások	Frakció	Nem egyedileg leképezett olvasások	Frakció	Léképezett olvasások	Teljes leképezett olvasások %-a
Exon-exon olvasások	1.701.971	0,92	155.732	0,08	1.857.703	3,88
Exon-intron olvasások	276.153	0,94	16.194	0,06	292.347	0,61
Teljes exon olvasások	11.590.783	0,90	1.219.913	0,10	12.810.696	26,78
Teljes intron olvasások	30.631.705	0,87	4.385.491	0,13	35.017.196	73,22
Teljes gén olvasások	42.222.488	0,88	5.605.404	0,12	47.827.892	100,00

8. táblázat A nilotinibbel kezelt csoport szekvenálásának leolvasási adatai

	Egyedileg leképezett olvasások	Frakció	Nem egyedileg leképezett olvasások	Frakció	Léképezett olvasások	Teljes leképezett olvasások %-a
Exon-exon olvasások	2.238.860	0,91	224.595	0,09	2.463.455	3,98
Exon-intron olvasások	363.731	0,95	19.495	0,05	383.226	0,62
Teljes exon olvasások	15.797.300	0,91	1.644.899	0,09	17.442.199	28,20
Teljes intron olvasások	39.460.804	0,89	4.944.163	0,11	44.404.967	71,80
Teljes gén olvasások	55.258.104	0,89	6.589.062	0,11	61.847.166	100,00

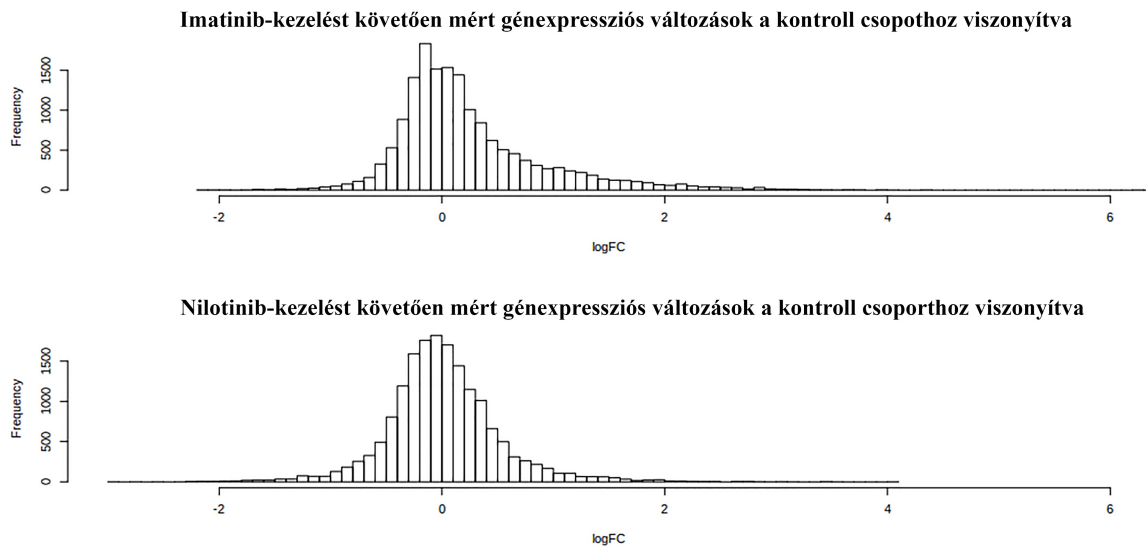
5.3. A kezelések hatására bekövetkezett génexpressziós változások vizsgálata

A génneveket, ensemble azonosítókat és a génekhez rendelt statisztikai változókat tartalmazó adattáblázataink alapján, megvizsgáltuk, az azonosított gének sokaságát leíró adatokat.

A rendelkezésre álló adatokból a paraméteres eljárások csoportjába tartozó egymintás t teszt statisztikai vizsgálatokhoz az imatinibbel és a nilotinibbel kezelt csoportokban a kontroll csoporthoz viszonyított génexpressziós változás mértékét kifejező FC (génexpressziós változás mértéke) értékek logaritmusát (logFC) használtuk.

LogFC értékük alapján, ábrázoltuk az imatinib kontroll csoporthoz képest mutatott expressziós változásait, valamint a nilotinib kontroll csoporthoz képest mutatott expressziós változásait. Mindkét hatóanyag esetében az adatok normáloszlást mutattak, és a kritikus tartományt vizsgálva, látható, hogy az imatinib nagyobb mértékben változtatja meg a génexpressziót, mint a nilotinib. Az imatinibbel szemben a nilotinibnél

kevesebb génexpressziója változott meg [12. ábra], valamint az átlagos logFC érték is nagyobb az imatinib esetén.



12. ábra Génexpressziós változásokat bemutató hisztogramok: A kritikus tartományt vizsgálva jól látható, hogy a logFC értékek alapján az imatinib kezelést követően több gén expressziója változott meg, mint a nilotinib kezelést követően. Az imatinib és a nilotinib pozitív irányba változtatta meg a génexpressziókat, vagyis inkább upregulálta a géneket.

Ezt megfigyelést erősítik meg, az egymintás t teszt eredményeit összefoglaló táblázatban feltüntetett eredmények is [9. táblázat]. A táblázatban feltüntetett t próbastatisztika értékeit figyelembe véve a két hatóanyagnál, elmondható, hogy imatinib esetében a $t=46,157$ jóval nagyobb, mint a kritikus érték, ezért elfogadjuk az alternatívhipotézist, azaz, hogy történt expressziós változás. Nilotinib esetében viszont a $t=1,835$ érték nem haladja meg szignifikánsan a kritikus értéket, de mivel nagyobb a kritikus értéknél, ezért elfogadjuk az alternatívhipotézist, de figyelembe vesszük, hogy csak kisebb mértékű expressziós változás történt. A p-értéknél az alternatívhipotézis elfogadásának feltétele ($p<0,05$) csak az imatinib esetében teljesül ($p<2.2e-16$). A kontroll csoporthoz képest mutatott, átlagos génexpressziós változások értékét jelző logFC átlag érték az imatinib esetében 0,242, ami nagyobb, mint 0, tehát elfogadhatjuk az alternatív hipotézist, nilotinib esetében ez az érték viszont csak 0,007, ami nagyon közel van a 0-hoz, így itt, habár történt génexpressziós változás, de az nem tekinthető szignifikánsnak. Az elvégzett t teszt eredményeit összefoglalva az látszik, hogy az imatinib jelentősen megnöveli a

génexpressziót a vizsgált sejtekben, ezzel szemben a nilotinib nem növelte meg szignifikánsan a génexpressziót a vizsgált sejtekben.

9. táblázat Az egymintás t teszt eredményeinek összefoglalása: statisztikai számításainkhoz, valószínűségi változóknak, az imatinibbel és a nilotinibbel kezelt csoportokban a kontroll csoporthoz viszonyított génexpressziós változás mértékét kifejező logFC értékeket választottuk. A logFC átlag jelzi, a kontroll csoporthoz képest mutatott, átlagos génexpressziós változások értékét. A t, a t próbastatisztika értéke. A df a szabadsági fokot jelöli, amely az érvényes megfigyelések száma-1. A t és p értékek alapján az imatinib kezelés jelentősen megváltoztatta a génexpressziót, a nilotinib kezelés viszont nem változtatta meg jelentősen a génexpressziókat.

logFC értékek alapján elvégzett egymintás t-teszt eredményei					95%-os konfidencia intervallum	
Vizsgált valószínűségi változó	t	df	p-érték	logFC átlag	alsó küszöbértéke	felső küszöbértéke
logFC _{imatinib}	46,157	16.382	<2.2e-16	0,242	0,231	0,252
logFC _{nilotinib}	1,835	16.950	0,06657	0,007	-0,001	0,015

5.4. Szignifikánsan változott gének azonosítása

Az imatinibbel kezelt oszteoblaszt sejtekben 16.383, a nilotinibbel kezelt csoportban 16.951, a kezeletlen, kontroll sejtekben pedig 17.290 féle annotált RNS-t azonosítottunk. Benjamini and Hochberg statisztikai teszttel imatinib kezelést követően 358, nilotinib kezelést követően 21 statisztikailag szignifikáns expressziós változást mutató gént azonosítottunk a kontroll sejtekhez képest.

A statisztikailag szignifikáns gének között 3 közös gén volt a két kezelt csoportban (*AI593442*, *Gm11225*, *Zfp184*), közel azonos expressziós aktivitással. A gének logFC értékei: logFC(*AI593442*) = 2,95, logFC(*Gm11225*) = 2,09 and logFC(*Zfp184*) = 1,45 az imatinibbel kezelt sejteknél, logFC(*AI593442*) = 2,82, logFC(*Gm11225*) = 2,79 és logFC(*Zfp184*) = 3,43 a nilotinib csoportnál. Az imatinibbel kezelt csoportban minden azonosított szignifikáns gén upregulált volt. A nilotinibbel kezelt csoportban egy

kivételével ($\log_{FC}(\text{RP23-390C13.1})=-2,95$) szintén mind upregulált volt \log_{FC} értékük alapján.

5.5. Kanonikus útvonal elemzés

Mindkét hatóanyag esetén a statisztikailag szignifikáns expressziós változást mutató géneket IPA kanonikus útvonal elemző szoftverrel értékeltük ki. Az imatinibbel kezelt oszteoblaszt sejteknél 6 top kanonikus útvonalat [13. ábra] míg a nilotinibbel kezelt oszteoblaszt sejtek transzkriptómájában öt top kanonikus jelátviteli útvonalat azonosítottunk [13. ábra]. A két hatóanyagnál azonosított top jelátviteli útvonalak egy útvonal kivételével (Gamma-amino-vajsav (GABA) receptor jelátviteli útvonal) különböznek, és a várt Wnt jelátviteli útvonal szerepe egyik csoportban sem volt igazolható. Annak ellenére, hogy az azonosított kanonikus útvonalakhoz tartozó p-értékek jelentősen meghaladják a szignifikancia küszöbértékét ($p \leq 0,05$), a szoftver nem tudta megjósolni az útvonalak aktivitási mintázatát.

5.5.1. Az imatinibbel kezelt oszteoblaszt sejteknél azonosított top kanonikus útvonalak

5.5.1.1. Reelin jelátviteli útvonal

A Reelin jelátviteli útvonal a legalacsonyabb p-értékkel képviseli az imatinibbel kezelt csoport a legszignifikánsabb útvonalát. A Reelin egy nagy extracelluláris glikoprotein, amely többek között részt vesz neuronális architektonikus mintázatok kialakításában valamint axonok növekedésének és disztribúciójának szabályozásában. A Reelin a VLDLR és az ApoER2 receptorokhoz kötődve aktiválja a Dab1 tirozin oldalláncának foszforilációját, amely számos nem receptor tirozin kinázzal lép kapcsolatba (Src, Fyn, Abl). Bár az idegrendszerrel áll szoros kapcsolatba, genom szintű asszociációs vizsgálatok (GWAS) igazolják, hogy az abnormális csont remodelinggel járó otoszklerózis kialakulásában a RELN fontos szerepet játszik [53].

Ezt az útvonalat a következő 6 gén reprezentálja, MAP3K9, MAPK8IP2, ITGA2, DAB1, RELN és DCX. A gének \log_{FC} értékei a következők: $\log_{FC}(\text{MAP3K9}) = 3,41$, $\log_{FC}(\text{MAPK8IP2}) = 2,10$, $\log_{FC}(\text{ITGA2}) = 2,35$, $\log_{FC}(\text{DAB1}) = 2,24$, $\log_{FC}(\text{RELN}) = 3,71$ és $\log_{FC}(\text{DCX}) = 1,86$.

5.5.1.2. Zsírsv aktivációs jelátviteli útval

A zsírsv aktivációs jelátviteli útval fő feladata a megfelelő zsírsv és lipid bioszintézis biztosítása. Rendellenes működésének következményei lipid metabolizmussal vagy vitamin és ásványi anyag metabolizmussal járó betegségek lehetnek. Mivel a csonttömeg nagy részét zsír teszi ki, ezért a csontvelősejt éréséhez és fejlődéséhez is nagyon fontosak a zsírsv és a lipid molekulák.

Ezt az útvalat az ACSL6 és ACSBG2 gének reprezentálják. Ezeknek a géneknek a logFC értékei 3,39 és 2,42. Ezeket a géneket az IPA a γ -linolénsav bioszintézis útvalhoz is hozzá rendelte, ami szintén felelős a lipid metabolizmusért.

5.5.1.3. Gamma-amino-vajsav (GABA) receptor jelátviteli útval

A gamma-amino-vajsav (GABA) receptor jelátviteli útval elsősorban az idegrendszer jelátvitelét szabályozza. Rendellenes működése aminosav metabolizmussal, lipid metabolizmussal, valamint molekuláris transzporttal kapcsolatos betegségeket okozhat. Három ismert receptor típusa (GABA(A), GABA(B) és GABA(C)) közül. A GABA(A) és GABA(C) ioncsatornaként működik, a GABA(B) receptor pedig egy G protein kapcsolt receptor.

Kísérleteink során két ion-csatorna (GABRQ és GABRG3), egy G protein kapcsolt receptor B (GABBR2) és az 1 típusú adenilát cikláz gén (ADCY1) kapcsolódott ehhez az útvalhoz. A logFC értékek a következők voltak: 2,69, 1,95, 2,74 és 3,16.

5.5.1.4. Szertoli-szertoli sejt interakciós jelátviteli útval

A szertoli-szertoli sejt interakciós jelátviteli útval szerepét elsősorban a testis sejtjeinek növekedésében, proliferációjában és fejlődésében írták le. Működése fontos a sejtek megfelelő alakjához, szerveződéshez és működéséhez is. Erre a jelátvitelre a TGF β 3 a p38 MAPK, JNK és ERK jelátviteli útvalakon keresztül, a TNF pedig a JNK útvalon keresztül fejt ki hatását.

Kísérleteinkben ezt az útvalat 7 gén prezentálta. A logFC értékek a következők voltak:
 logFC(CLDN10) = 1,94, logFC(MAP3K9) = 3,41, logFC(EPB4.1) = 2,51,
 logFC(CTNNA2) = 2,76, logFC(CLDN4) = 2,21, logFC(ITGA2) = 2,35,
 logFC(Gucy1b2) = 2,86.

5.5.1.5. γ -linolénsav bioszintézis útvonal

A γ -linolénsav (GLA) egy többszörösen telítetlen (18:3) omega-6 zsírsav. Ez az útvonal, hasonlóan a zsírsav aktivációs jelátviteli útvonalhoz, szintén felelős a lipid metabolizmusért, valamint a vitamin és ásványi anyag metabolizmusért. A szoftveres kiértékelés során, a program ehhez az útvonalhoz is ugyanazokat a géneket rendelte (ACSL6, ACSBG2), mint a zsírsav aktivációs jelátviteli útvonalhoz

5.5.1.6. Szerotonin receptor jelátviteli útvonal

Végül a Szerotonin receptor jelátviteli útvonal, melyről igazolták, hogy erős pozitív hatása van a csonttömegre. A vizsgálatunkban ez az útvonal 3 génnel képviselteti magát. A három kapcsolódó gén logFC értékei: $\logFC(\text{HTR5A}) = 2,06$, $\logFC(\text{ADCY1}) = 1,45$, $\logFC(\text{HTR1A}) = 2,88$.

5.5.2. Az nilotinibbel kezelt oszteoblaszt sejteknél azonosított top kanonikus útvonalak

5.5.2.1. Eukarióta iniciációs faktor 2 (EIF2) jelátviteli útvonal

A nilotinibbel kezelt oszteoblaszt sejtek transzkriptómájában azonosított öt top kanonikus jelátviteli útvonal [13. ábra] közül, a legkisebb p-értékkel, az eukarióta iniciációs faktor 2 (EIF2) jelátviteli útvonal volt a legszignifikánsabb, habár az aktivációs z-score értéke majdnem nulla volt.

Az EIF2 jelátvitelnek fontos szerepe van a transzláció kialakulásában, mivel a többszörös polipeptid alegységeket tartalmazó eIF molekulák szükségesek a fehérjeszintézis kezdő lépéséhez. Az eIF2 GTP-kötő fehérjeként szabályozza a mRNS transzlációt és a fehérjeszintézist. Ez az útvonal felelős a sejtnövekedésért, proliferációért és fejlődésért is. Rendellenes működése megváltoztathatja a fehérje szintézist, gén expressziót és a sejtek túlélését.

Az útvonalat reprezentáló három gén logFC értékei: $\logFC(\text{RPL17}) = 2,41$, $\logFC(\text{RPL39}) = 1,99$, $\logFC(\text{RPS23}) = 3,45$.

5.5.2.2. Embrionális őssejt differenciálódás szív sejt vonal irányba

Ez az útvonal fontos szerepet játszik a sejtnövekedésben, sejtproliferációban, sejtfelődésben, illetve a szervnövekedésben és szervfejlődésben. Rendellenes működése esetén megváltozhat a génexpresszió és az embrionális szervfejlődés.

A korai embrionális sejtek transzkripcióját szabályozó faktorok, mint például a NANOG, OCT4 és SOX2 fontos szerepet játszanak a csont anyagcserében is. Ezek közül saját kísérleteink eredményeként, a NANOG 2,06 logFC értékkel lett ehhez az útvonalhoz rendelve.

5.5.2.3. Az embrionális őssejtek transzkripciót szabályozó hálózata

Az OCT4, NANOG és SOX2 szintén részt vesznek ennek az útvonalnak a működésében is. Ennél az útvonalnál a jelátvitel során az OCT4, NANOG és SOX2 pluripotencia aktiválásában, önmegújuló mechanizmusokban résztvevő, illetve, differenciálódást gátló géneket aktiválnak. Ez az útvonal is részt vesz a sejtnövekedésben, proliferációban és fejlődésben, szervnövekedésben és fejlődésben, transzkripció-szabályozásban.

Kísérleteinkben ezt az útvonalat is a NANOG reprezentálta.

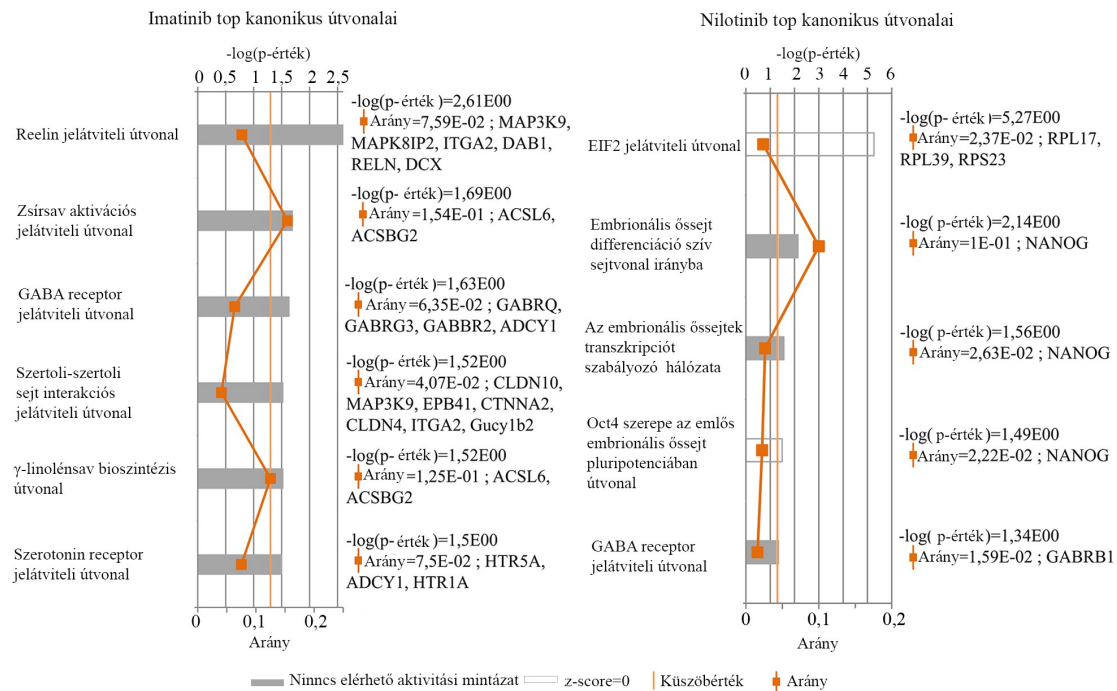
5.5.2.4. Oct4 szerepe az emlős embrionális őssejt pluripotenciában útvonal

Oct4 egy homeodomain transzkripciós faktor, a POU (Pit-Oct-Unc) család tagja. Központi szerepe van például az önmegújulásban és a pluripotenciában. Az Oct4, SOX2, NANOG együtt fejtik ki hatásukat. Az Oct4 és a Sox2 kölcsönösen szabályozzák a POU5F1-t, és pozitívan szabályozzák a NANOG-t. Ez az útvonal részt vesz a sejtnövekedésben, proliferációban és fejlődésben, szervnövekedésben és transzkripció-szabályozásban.

Ezt az útvonalat is a NANOG reprezentálta a kísérletei eredményeinkben.

5.5.2.5. Gamma-amino-vajsav (GABA) receptor jelátviteli útvonal

GABA receptor jelátviteli útvonalat a GABRB1 (gamma-amino-vajsav (GABA) A receptor, béta 1 alegysége) gén jellemzi, logFC = 2,83 értékkel. A GABA receptor jelátviteli útvonal volt az egyedüli, amely mindkét hatóanyag esetén a top kanonikus útvonalak között szerepelt.



13. ábra Az IPA kanonikus útvonal analízis eredményének grafikus összefoglalása.

Az ábra, az útvonalak right-tailed Fisher exakt teszt használatával meghatározott $-\log(p\text{-érték})$ -ei alapján, a legszignifikánsabb kanonikus útvonalakat jeleníti meg. Az útvonalakhoz tartozó $-\log(p\text{-érték})$ -ek az ábra mellett illetve a felső tengelyen olvashatóak le. Minél nagyobb az adott útvonalhoz tartozó $-\log(p\text{-érték})$, azaz minél kisebb az útvonalhoz tartozó $p\text{-érték}$, annál szignifikánsabb az adott útvonal. A $P=0,05$ értéknél lévő narancssárga vonal jelzi a statisztikai küszöbértéket. A szürke és a fehér oszlopok azt jelzik, hogy az adott útvonalak aktiváltságát vagy gátoltságát a szoftver a z-score értékek alapján nem tudta megjósolni. Fehér szín esetén az útvonal aktivitásának meghatározását az gátolta, hogy a z-score érték nulla vagy nullához nagyon közeli. A szürke szín esetén pedig nincs elérhető aktivitási mintázat, ezért nem lehet megbecsülni jelenleg az adott útvonal aktivitását. Az ábrán látható sárga kockákkal jelzet arány kiszámításakor a saját kísérleti eredményeink alapján az adott útvonalhoz hozzárendelhető gének számát elosztottuk az IPA adatbázisa alapján az útvonalhoz tartozó összes génnel. Az ábra mellett az adott útvonalakhoz rendelt, a kezelés hatására szignifikáns expressziós eltérést mutató gének is ki vannak listázva.

5.5.3. Azonosított top upstream regulátorok

A top upstream regulátorokat az IPA szoftver az expressziós változások minősége alapján határozta meg. Olyan molekulákat választott ki, amelyek hasonló változásokat idéznének elő, vagyis olyan változások történtek a vizsgálataink során, mintha ezek a molekulák szabályoztak volna.

Ezek a felsőbb szintű transzkripciós szabályozó elemek magyarázatot adhatnak a megfigyelt génexpressziós változásokra. A top upstream regulátorok elemzése során, statisztikailag szignifikánsnak a $P < 0,01$ értéket tekintettük, Fisher Exakt tesztet alkalmazva.

Az imatinibbel kezelt oszteoblaszt sejtek csoportjához a következő, öt upstream regulatort rendelte a szoftver: *FREM2*, *GLDN*, *GRIP1*, *NRCAM* és *VLDLR*. Ezek közül a *FREM2*, *GRIP1* és a *VLDLR* közvetett módon részt vehet a csont élettani folyamataiban.

A nilotinibbel kezelt oszteoblaszt sejt kultúrákból származó minták kiértékelése során szintén, öt top upstream regulatort azonosított a szoftver: *ACVR1B*, *ACVR1C*, *FAAH*, *MARCH7* és *RAD23B*. A nilotinibnél azonosított öt top upstream regulator mindegyikéről ismertek adatok a csontanyagcserével összefüggésben.

Az imatinib illetve nilotinib kezelés hatására azonosított upstream regulatorokat kódoló gének összefoglalása, és azok csontanyagcseréhez köthető biológiai funkcióinak áttekintése a 10. és a 11. táblázatban láthatóak.

10. táblázat Az imatinibbel kezelt sejtekben azonosított upstream regulátorok. A gének neveit és általános biológiai szerepüket a GeneCards (<http://www.genecards.org>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) és az IPA (<https://reports.ingenuity.com>) adatbázisaiból gyűjtöttük. Az upstream regulátorokat és azok interakcióit az IPA elemzés eredményi adták. A csontanyagcseréhez köthető biológiai szerepüket a felsorolt adatbázisokból és a szakirodalomból gyűjtöttük.

Gén szimbólum és név	Általános biológiai funkció és a csontanyagcsere szabályozásában betöltött szerep	Szabályozása alatt álló elemek
<i>FREM2</i> FRAS1 fehérjéhez kapcsolt extracelluláris mátrix fehérje 2	Extracelluláris mátrix protein, szükséges a hám integritásának fenntartásához és az epidermális adhézióhoz. Közvetett módon részt vehet a csont élettani folyamatainak regulálásában, mivel kapcsolatban áll olyan molekulákkal, melyek pl: az oszteokalcin génexpresszió szabályozásában vesznek részt (<i>MDM2</i>) [54], a csonttörés gyógyulását támogatják (<i>EGFL6</i>) [55], és az oszteoblaszt differenciálódást serkentik (<i>NPNT</i>) [56].	FREM1, FRAS1, FREM2
<i>GLDN</i> Gliomedin	Ranvier befűződés kialakulásában vesz részt a mielinhüvelyes axon mentén.	Feszültségfüggő nátrium csatorna, SPTBN4, ANK3, NFASC
<i>GRIP1</i> Glutamát receptorral kölcsönható fehérje 1	Az általa kódolt protein elsősorban az idegsejtek transzportfolyamataiban vesz részt. Jelet közvetít a citoskeletális és membrán fehérjék között. Interakcióba lép számos csonttömeg növekedést befolyásoló molekulával (<i>NR1I3</i> , <i>MEF2C</i> , <i>ESR1</i>) [57-59], valamint az oszteoblasztok differenciálódását befolyásoló ösztrogén-szerű receptor alfával is (<i>ESRRA</i>). Továbbá kapcsolatban áll, olyan molekulákkal, melyek serkentik a növekedési faktorok aktivitását (TFF1), serkentik a zsírsav bioszintézist és a glükoneogenezist (HNF4A) [60], és fontos szerepet játszanak a csont-homeosztázisban (CARM1 [61], Ephrin B [62], THRA).	FRAS1, GRIA2, NR1I3, GRIP1, FREM2, FREM1, ESRRA, TFF1, HNF4A, ESR1, MEF2C, kinezin, ampa receptor
<i>NRCAM</i> Neuronális sejt adhéziós molekula	Az immunoglobulin szupercsalád tagja. A gén által kódolt Ankyrin-kötő fehérje részt vesz a neuron-neuron sejt adhézióban, továbbá a Ranvier befűződés kialakulásának molekuláris folyamataiban.	Feszültségfüggő nátrium csatorna, NFASC, SPTBN4, ANK3, NRCAM, GLDN, neurotrofin
<i>VLDLR</i> Nagyon alacsony denzitású lipoprotein receptor	Lipoprotein receptor, amelynek szubsztátja a nagyon alacsony denzitású lipoprotein molekula. Hozzákapcsolódva, endocitózissal a sejt belsejébe juttatja azt. Szerepet játszik a VLDL-triglicerid metabolizmusban és a Reelin jelátviteli útvonalban is. Szabályozza a zsírsavakat, melyek fontos szerepet játszanak a csontok újjáépülésében és a csontok megfelelő mechanikai tulajdonságainak megtartásában. Koleszterin szint szabályozásán keresztül hathat a csont ásványianyag-tartalomra [63]. Az oszteoblaszt proliferációt serkenti.	Koleszterin, triacilglicerin, DAB1, Ptk, DNS endogén promotor, foszfolipid, zsírsav, RAC1, LPL, SERPINE1, glikoprotein, RNS polimeráz II, VLDL

11. táblázat A nilotinibbel kezelt sejtekben azonosított upstream regulátorok. A gének neveit és általános biológiai szerepüket a GeneCards (<http://www.genecards.org>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) és az IPA (<https://reports.ingenuity.com>) adatbázisaiból gyűjtöttük. Az upstream regulátorokat és azok interakcióit az IPA elemzés eredményi adták. A csontanyagcseréhez köthető biológiai szerepüket a felsorolt adatbázisokból és a szakirodalomból gyűjtöttük.

Gén szimbólum és név	Általános biológiai funkció és a csontanyagcsere szabályozásában betöltött szerep	Szabályozása alatt álló elemek
<i>ACVR1B</i> 1B típusú aktivin receptor	Transzmembrán receptor. Az 1-es típusú aktivin receptor komplexet képez a 2-es típusúval, és az így kialakuló komplex szabályozza pl: az idegsejt differenciálódást és túlélést, szőrtüszőfejlődést, FSH termelést, sérülésgyógyulást, extracelluláris mátrix termelődést, immunszuppressziót és karcinogenezist. Az <i>ACVR1B</i> az aktivin útvonal részeként szerepet játszik a csontvázrendszer fejlődésében. Aktivin rendszer szabályozza a csontsejt differenciálódást és proliferációt [64]. Az <i>ACVR1B</i> , számos csont anyagcserére erősen ható molekulát szabályoz (pl: <i>SMAD3</i>).	<i>SMAD2</i> , <i>SMAD3</i> , <i>LEFTY1</i> , <i>LEFTY2</i> , <i>FSHR</i> , <i>CYP19A1</i> , Aktivin, <i>Xnr1</i> , <i>NODAL</i> , <i>L-treonin</i> , <i>DNS</i> endogén promoter, <i>HP</i> , <i>MAPK</i> , <i>Akt</i>
<i>ACVR1C</i> 1C típusú aktivin receptor	Az aktivin AB, aktivin B és a <i>NODAL</i> receptora. Részt vesz a sejt differenciálódásban, növekedésgátlásban és az apoptózisban. A csontfejlődésben és a remodeling során fontos molekulákat szabályoz (pl: <i>ephrinB2</i> , <i>CASP3</i> , <i>SMAD3</i>). Szerep van az inzulin és glükóz válaszban, valamint a <i>TGFβ</i> és a <i>Wnt/β-catenin</i> jelátvitelben.	<i>ephrinB2</i> , <i>CASP3</i> , <i>SMAD2</i> , <i>SMAD3</i> , <i>LEFTY1</i> , <i>LEFTY2</i> , <i>FOS</i> , <i>MAPK8</i> , <i>NODAL</i> , <i>Erk</i> , <i>SERPINE1</i> , <i>Jnk</i> , <i>CASP9</i> , <i>JINK1/2</i> , <i>P38</i> <i>MAPK</i>
<i>FAAH</i> Zsírsvamid-hidroláz	Az általa kódolt integrális membrán fehérje a zsírsvamidok hidrolíziséért felelős. A <i>FAAH</i> fehérje szerepet játszik a proliferációban, sejt életképességben. Részt vesz a zsírsv bioszintézisben és metabolizmusban, a lipid metabolizmusban és modifikációban. A működése során keletkező zsírsvamidok hatással vannak az oszteoblasztokra és az oszteoklasztokra, stimulálják a csontépítést és gátolják a reszorpciót [65].	zsírsavak, anandamid, endokannabinoid , <i>MAEL</i> , <i>FNDC3A</i> , <i>SEPT4</i> , <i>Pr13d1</i> , <i>MAP6D1</i> , <i>RPL7L1</i> , <i>RPL5</i> , <i>RPS18</i>
<i>MARCH7</i> Membránkött ring ujj (C3HC4) 7, E3 ubiquitin fehérje ligáz	E3 ubiquitin ligázok ring ujj típusa. Ideiglenesen megkötö a célfehérjét és ubiquitint kapcsol hozzá. Az ubiquitinnel jelölt fehérje ezután lebontásra kerül. Ez a folyamat biztosítja a fehérjék dinamikus egyensúlyát a sejten belül. A <i>MARCH7</i> fehérje részt vesz a proliferáció szabályozásában, az <i>RNF111</i> -en keresztül hathat a <i>TGFβ</i> és <i>BMP</i> jelátviteli útvonalakra.	<i>NANOG</i>

<i>RAD23B</i> RAD23 homológ B (élesztő gomba)	Az ubiquitin-függő fehérje degradáció során, az poliubikvitinált fehérjék proteaszómához történő szállításában vesznek részt. A különböző proteaszómákon (<i>PSMC2</i> és <i>PSMC1</i>) keresztül közvetett hatása lehet az oszteoblaszt differenciálódásra és a kanonikus Wnt jelátvitelre.	PSMC1, TDG, Lys48-kapcsolt poliubikvitin, 26s proteaszóma, TP53, NGLY1, XPC, MPG, DNS promoter
--	---	--

5.5.4. Azonosított top molekulák

A szignifikáns változást mutató gének közül, az imatinib és a nilotinib kezelésre legérzékenyebb gének, a kezelt csoport kontroll csoporthoz viszonyított expressziós változás mértékét jelző, logFC értékeik alapján lettek meghatározva IPA elemzéssel.

Az útvonalelemzések során az expressziós változások mértéke alapján imatinib kezelés hatására, az STXBP5L, GDF10, HYDIN, NYAP2, AQP9, CSMD1, MYO3B, RELN, Eda, SLITRK5 géneket értékelte a szoftver leginkább érzékenynek a kezelés hatására, vagyis ezek expressziós változása volt a legnagyobb. Az expressziós változások mértéke alapján a nilotinib kezelés hatására leginkább érzékeny gének a következők: RPS23, ZFP184, EDNRB, DKK4, GABRB1, RPL17, KLHL41, NANOG, RPL39. Az imatinib kezelés után az STXBP5L gén mutatta a legerősebb upregulációt (21-fold), míg a nilotinib kezelést követően az RPS23 gén expressziója növekedett meg (11-fold) a legnagyobb mértékben a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az imatinib és a nilotinib kezelés hatására azonosított top molekulák rendkívül sokféle biológiai folyamatban vesznek részt és nagyrészüket a csontanyagcserében is érintett.

Mindkét csoportban az expressziós változások mértéke alapján az imatinib és nilotinib kezelésre legérzékenyebb, azaz a legnagyobb expressziós változást mutató gének listája és azok általános biológiai, valamint a csontanyagcseréhez köthető szerepe a 12. és a 13. táblázatban láthatóak.

12. táblázat Az imatinibbel kezelt sejtek IPA analízissel meghatározott top molekulái. A top molekulák a legupreguláltabb gének termékei. A gének neveit és általános szerepüket a GeneCards (<http://www.genecards.org>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) és az IPA (<https://reports.ingenuity.com>) adatbázisaiból gyűjtöttük. A logFC értékek a kutató munkánk eredményei. A top molekulák szabályozása alatt álló molekulákat az IPA szoftver szolgáltatta. A csontanyagcseréhez köthető biológiai szerepüket az említett adatbázisokból és a szakirodalomból gyűjtöttük. N/A: adat nem ismert.

Gén szimbólum és név	LogFC érték	Szabályozása alatt áll	Általános biológiai funkció és a csontanyagcsere szabályozásában betöltött szerep
STXBP5L Syntaxin kötő fehérje 5-szerű	4,40	Inzulin, D-glükóz	Szerepe van a vezikula transzportban és az exocitózisban. Részt vesz a fehérje szekréció szabályozásában és a fehérje transzportban. Részt vesz a glükóz homeosztázisban és negatív szabályozója az inzulin szekréciónak.
GDF10 Növekedési és differenciálódási faktor 10	4,33	SMAD2, SERPINE1	GDF10 (másik néven csont morfogénikus protein 3 B) a transzformáló növekedési faktor béta szupercsalád tagja. Részt vesz a csontváz morfogenezisben, apoptotikus folyamatokban, sejt fejlődésben, és a zsírsajt differenciálódásban. A GDF10 (BMP3b) részt vesz a csontrendszer fejlődésében és az oszteoblaszt differenciálódás folyamatában.
HYDIN HYDIN, axonéma centrális pár apparátus fehérje	3,97	N/A	Részt vesz a csillós motilitásban, axonéma összeszerelésben és az agy fejlődésében.
NYAP2 Neuronális tirozin-foszforilált foszfoinozítid-3-kináz adaptor2	3,94	N/A	Részt vesz a projekciós neuron morfogenezisben és a fehérjék megkötésében. Aktiválja a PI3K-t és ezzel egy időben kölcsönhatásba lép a WAVE1 komplexszel, és szabályozza az idegsejtek morfogenezisét. PIK3R1-en keresztül közvetve hat a csontreszorpció szabályozására [66] és a glükóz homeosztázisra [67, 68]. Erősíti az IGF-1 jelátvitelt és megnöveli a sejtek életképességét [69].
AQP9 Aquaporin 9	3,93	glicerin, víz, D-glükóz, karbamid, triglicerid, Gyk, Ins1, proinzulin, arzenit, PRKCB, MYC, BAX, CASP3	Az aquaporin membrán csatornák kizárólag a vizet és a töltetlen molekulákat (pl: karbamid, purin, pirimidin, glicerin) engedik át. Az aminosavakat, Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ ionokat és a deprotonált monokarboxilátokat kizárják. Szabályozza a csontreszorpciót [70], az oszteoklasztogenezist [71] és a csont ásványianyagtartalmát [70]
CSMD1 CUB és Sushi többszörös domén 1	3,79	D-glükóz, komplement fehérje	Részt vesz a glükóz homeosztázisban és a hirtelen fellépő nem várt stimulusok válaszütemében. Részt vesz a csontépítésben [72] Köthet a csonthomeosztázisban fontos szerepet játszó BCL6-hoz [73] és az oszteoblaszt differenciálódást szabályozó SETDB1-hez [74].
MYO3B Miozin IIIB	3,74	L-treonin, peptid	A sejtben miközben az aktin és miozin szálaik egymáson elcsúsznak, az aktinok aktiválják a miozinokat. Az alternatív splicing eredményeként különböző izoformák lehetnek.

RELN Reelin	3,71	DAB1, RELN, GSK3B, GRIN2B, NTRK2, AKT1, VLDLR, APP, SRC, FN1, NOTCH1, MAPT, L-tirozin, CRK, FABP7,	Szerepe van a sejt pozicionálásban és a neuronális migrációban az agy-fejlődés során. Szabályozza a mikrotubulusok működését a neuronokban. Számos olyan molekulával van kapcsolatban, melyek részt vesznek a csontnövekedés szabályozásában.
Eda Ektodiszlázia-A	3,69	NFkB, WNT10B, WNT10A, PTHLH, AREG, EPGN, FGF20	Az általa kódolt transzmembrán fehérje, a tumor nekrosis faktor (TNF) családba tartozik, és fontos szerepe van az ektodermális szövetek fejlődésében. Az ektodermális szervek morfogenezise során részt vesz a epiteliális-mezenchima jelátvitelben. Részt vesz az immun válaszban is. Támogatja a csont homeosztázis szabályozásában résztvevő kanonikus Wnt jelátvitelt, és az NF-kappaB kaskád, ami fontos szerepet játszik az oszteoblaszt és oszteoklaszt aktivitásban. Részt vesz a sejt differenciálódásban. Csontvázrendszer fejlődésének szabályozása.
SLITRK5 SLIT és NTRK-szerű család, 5. tagja	3,69	N/A	A SLITRK család tagjait főként idegszövetek expresszálják. A SLITRK5 gén részt vesz az axongenezisben, dendrit morfogenezisben, bőr fejlődésben és a xenobiotikus stimulusokra adott válaszban.

13. táblázat A nilotinibbel kezelt sejtek IPA analízissel meghatározott top molekulái. A top molekulák a legupreguláltabb gének termékei. A gének neveit és általános szerepüket a GeneCards (<http://www.genecards.org>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) és az IPA (<https://reports.ingenuity.com>) adatbázisaiból gyűjtöttük. A logFC értékek a kutató munkánk eredményei. A top molekulák szabályozása alatt álló molekulákat az IPA szoftver szolgáltatta. A csontanyagcseréhez köthető biológiai szerepüket az említett adatbázisokból és a szakirodalomból gyűjtöttük. N/A: adat nem ismert.

Gén szimbólum és név	logFC érték	Szabályozása alatt áll	Általános biológiai funkció és a csontanyagcsere szabályozásában betöltött szerep
RPS23 Riboszómális fehérje S23	3,45	rnr	A riboszóma 40S alegységének fehérjét kódolja.
ZFP184 Cink ujj fehérje 184	3,43	N/A	Részt vesz a szekvencia specifikus DNS kötésben, és a transzkripció szabályozásban.
EDNRB B típusú endotelin receptor	3,04	ciklooxygenáz, SLC9A3, nitrogén monoxid, VEGFA, EDN1, Nos, HIF1A, TYR, DNS promotor, Adcy, Ca ²⁺ , GNAI1, GNAO1, RNS polimeráz II	Az általa kódolt fehérje az endotelin 1, 2, és 3 nem specifikus G-fehérje kapcsolt receptora. Elsősorban a vaszkuláris endotél sejtekben található. Részt vesz a vazokonstrukcióban, vazodilatációban, és a sejt proliferációban. Szerepe van a proliferációban, differenciálódásban, apoptózisban, migrációban. Számos olyan vegyületet szabályoz, melyeknek fontos szerepe van a csontok élettani folyamataiban: például az endothelin-1 csontépítésre stimulálja az oszteoblaszt sejteket [75-79] ; a ciklooxygenáz enzimek támogatják a csont gyógyulást [80] ; a nitrogén oxidok részt vehetnek a

			csont remodelingben ; a VEGFA jótékony hatással van a csontgyógyulásra és a csont ásványianyag-tartalomra [81] ; a HIF1A (hipoxia indukációs faktor 1, alfa alegység) fontos szerepe van a csontépítésben [82] ; a GNAQ (guanin nukleotid kötő fehérje, alfa q polipeptid) erősíti a kanonikus Wnt jelátvitelt az FZD-n keresztül [83].
DKK4 Dickkopf homológ 4	2,99	N/A	A dickkopf család tagja. A szekretált fehérje részt vesz az embrionális fejlődésben, a Wnt jelátviteli útvonallal való kapcsolatán keresztül. DKK-k fontos szerepet játszanak a gerincesek fejlődésében, ahol lokálisan gátolják a Wnt által szabályozott folyamatokat, mint például a végtag fejlődés. DKK-k felnőttekben részt vesznek a csontépítésben és a csont betegségekben is. Támogatja az oszteoblaszt apoptózist, gátolja a proliferációt, differenciálódást és a Wnt/ β -katenin jelátviteli utat [84]
GABRB1 Gamma-amino-vajsav (GABA) A receptor, béta 1 alegysége	2,83	ion, klorid	A gamma-amino-vajsav A receptor egy több alegységű klorid csatorna, ami a gátló szinaptikus ingerületátvitelt közvetíti a központi idegrendszerben.
RPL17 Riboszómális protein L17	2,41	N/A	A riboszóma 60S alegységének fehérjét kódolja A genomban több pszeudogénje is megtalálható.
KLHL41 Kelch-szerű fehérjecs család 41. tagja	2,37	N/A	A kelch-like család tagja. Feltételezések szerint a vázizom fejlődésben és differenciálódásban van szerepe. Szabályozza a mioblaszt proliferációt és differenciálódást, és szerepe van a miofibrillum összeállításban. Szükséges a pszeudopod elongációhoz a transzformált sejtekben.
NANOG Nanog homeobox	2,06	GATA4, FAK, NANOG, FOXD3, POU5F1, PDCD4, CDK6, AHR, GATA6, ZFP42, DNS promotor, DNS endogén promotor, RNS polimeráz II, SEC22B, PCDHA2,	Transzkripció szabályozó. Részt vesz az embrionális őssejt proliferációban és az önmegújuló folyamatokban. Az embrionális őssejt csont morfogénikus fehérje indukálta mezoderm differenciálódást blokkolja, a SMAD1 interakcióval. Transzkripciós aktivátorként és represszorként is működik. Gátolja a csont morfogénikus kaszkádokat és a Wnt jelátviteli utat. Részt vesz a csontgyógyulásban [85].
RPL39 Riboszómális protein L39	1,99	N/A	A riboszóma 60S alegységének fehérjét kódolja.

6. Megbeszélés

Az onkohematológiai betegségek kezelésében széles körben alkalmazott BCR-ABL specifikus tirozin-kináz gátlók (például: imatinib, nilotinib), a betegek hosszú távú túlélését biztosítják, azáltal, hogy kis molekulájú ATP kompetitív vegyületként gátolják a BCR-ABL fúziós fehérje tirozin-kináz aktivitását, melynek eredményeként gátolják a BCR-ABL pozitív tumorsejtek proliferációját és azokban apoptózist indukálnak. Megjelenésüket követően rövid idővel a szakirodalomban ismertetett vizsgálatok jelentős része arról számolt be, hogy ezen elterjedten használt tirozin-kináz gátló gyógyszerhatóanyagok (például: imatinib), hatással vannak a csontanyagcserére is, és komplex módon változtatják meg a csontszövet élettanát. Kezdetben számos kutatócsoport jutott arra az eredményre, hogy az említett tirozin-kináz gátlók pozitív hatással vannak a csontanyagcserére, például megváltoztatják a csontátépülést, befolyásolják a kalcium és foszfát anyagcserét, hatásukra nő a csont ásványianyagtartalma és mennyisége, nő a szivacsos csontállomány. Osteopéniás és osteoporózisos CML-es betegeknél is megfigyelték a szivacsos csontállomány mennyiségi növekedését imatinib terápia hatására. De a folyamatok pontos hatásmechanizmusairól és a jelátviteli utak működésének változásairól kevés ismeret állt rendelkezésre.

Hazánkban a csontanyagcsere betegségei (például: osteoporózis) rendkívül gyakoriak a népesség körében és jelentős népegészségügyi problémát jelentenek. Ezért, miután, kezdetben, a szakirodalomban számos tanulmány számolt be arról, hogy a hematológiai betegségek kezelésénél használt tirozin-kináz gátlók hatására változásokat tapasztaltak a csontanyagcserében, és valamennyi kísérlet eredménye, az volt, hogy a tirozin-kináz gátlók hatására a csontanyagcsere egyensúly a csontépítés irányába tolódott el, fontos feladatnak éreztük, az ismeretlen hatásmechanizmusok molekuláris hátterének mélyebb megértését, valamint a jelátviteli útvonalak azonosítását.

Ezen mechanizmusok molekuláris hátterének jobb megismerését indokoltnak tartottuk, egyrészt azért, mert a kezelések hosszú évtizedekig, vagy akár élethosszig is tarthatnak, ezért a terápia hosszú távú hatásainak megismerése is fontossá vált, más részt azért, mert a tirozin-kináz gátlók (például: imatinib és a nilotinib) hatására osteoblasztokban aktiválódott útvonalak megismerése terápiás lehetőséget jelenthet a jövőben a csontbetegségek célzott kezelésében.

A tirozin-kináz gátlók szakirodalomban ismertetett csontsejtekre gyakorolt jelentős hatásai miatt, az onkohematológiai betegségek kezelésében elterjedten használt két BCR-ABL specifikus tirozin-kináz gátló hatóanyagnak, az imatinibnek és nilotinibnek vizsgáltuk meg az egér oszteoblaszt sejtek génkifejeződéseire gyakorolt hatását a teljes transzkriptom szintjén *in vitro* rendszerben. A nilotinib hatása megegyezik az imatinibével, ezért azt feltételeztük, hogy, habár jóval szelektívebb tirozin-kináz gátló, hasonló csontanyagcserét érintő változásokat fog előidézni.

A tirozin-kináz gátlók csonthatásait vizsgáló korábbi sokszor egymásnak ellentmondó tanulmányokban (a vizsgált sejtek eltérő érettségi állapota [3], valamint az alkalmazott eltérő hatóanyag-koncentráció miatt [3, 11]), csak a csontszövetre legjellemzőbb gének (például: RANKL, OPG, csont szialoprotein, oszteokalcin, oszterix, BMP2 és RUNX2) expressziós adatairól számoltak be [2-4, 11]. Azonban komplex, sejtszintű transzkripció mintázatbeli elemzés a csontanyagcsere vonatkozásában ez idáig nem történt. Így az általunk végzett vizsgálat volt az első olyan vizsgálat, ahol a csontképzésben szerepet játszó oszteoblaszt sejtek teljes mRNS készletét és annak a kezelés hatására bekövetkezett expressziós változását, teljes transzkriptóma analízissel elemeztük. Ezáltal lehetőségünk nyílt elsőként bemutatni azokat a top jelátviteli rendszereket, upstream regulator géneket és top molekulákat, melyek a két vizsgált hatóanyag alkalmazását követően azonosíthatóak voltak az oszteoblaszt sejtekben tapasztalt szignifikáns génexpressziós változások alapján. Kiemelt figyelmet fordítottunk a hatóanyagok feltételezett csontanyagcsere módosító hatásainak értelmezésére és magyarázatára.

Mivel a kezelések évtizedekig vagy akár élethosszig is tarthatnak, ezért a kísérletek során igyekeztünk az *in vitro* kultúrák esetén használható lehető leghosszabb kezelést alkalmazni. *In vitro* vizsgálataink során az imatinib és nilotinib kezelések (6 napos inkubációs idő) hosszabb távú hatását vizsgálva, a bemutatott eredmények elsősorban nem a gyors, hanem a lassabban kialakuló másodlagos génaktivitásokban bekövetkező változásokat tükrözik.

A vizsgálatokhoz három csoportot alakítottunk ki: imatinibbel kezelt csoportot, nilotinibbel kezelt csoportot és egy kezeletlen kontroll csoportot. Minden esetben 3 párhuzamos mérést végeztünk. A kezelt és kezeletlen oszteoblaszt sejtekből RNS-t izoláltunk. Ezt követően a teljes transzkriptóma analízis kivitelezését SOLiD™ új generációs szekvenátor készüléken végeztük el. Az általunk vizsgált két hatóanyagnál

külön-külön közel 17.000 féle annotált RNS-t azonosítottunk a kezelt sejtekben. Vizsgálataink során mindkét hatóanyag esetében meghatároztuk a szignifikáns expressziós különbségeket mutató géneket, azonosítottuk a top jelátviteli rendszereket, az upstream regulátor géneket és a top molekulákat.

Saját kísérleteink alapján azt tapasztaltuk, hogy a két vizsgált tirozin-kináz gátló hatóanyag eltérő módon hat az oszteoblaszt sejtek génkifejeződési mintázatára, ezáltal az oszteoblaszt funkciókra. A statisztikailag szignifikáns különbséget mutató gének között csak 3 közös volt (*ZFP184*, *Gm11225*, *AI593442*) és többnyire más jelátviteli útvonalakat, más upstream regulátorokat és más top molekulákat azonosítottunk a két kezelt csoportban. A tapasztalt eltérő hatás magyarázata valószínűleg az lehet, hogy a vizsgált két hatóanyag eltérő kémiai szerkezettel és eltérő kinázprofillal rendelkezik [86]. Az imatinib a BCR-ABL célmolekulája mellett több sejtfelszíni tirozin-kináz receptorhoz is képes kapcsolódni, míg a nilotinib jóval specifikusabb, ezért a tirozin-kináz receptorok többségével nem kötődik.

Az imatinibbel és a nilotinibbel kapcsolatban, a szakirodalomban megjelent csontanyagcseréhez kapcsolódó alapkutatási eredmények, humán klinikai megfigyelések és a saját *in vitro* oszteoblaszt sejt kultúrákon végzett kísérleteink eredményei alapján, az imatinib és a nilotinib csontsejtekre gyakorolt hatása függ az alkalmazott hatóanyag-koncentrációtól, a sejtek érettségi állapotától, illetve az általuk kötött receptor tirozin-kináz útvonalak megoszlási arányától. Az imatinib és nilotinib csonthatása valószínűleg a csontsejtek fiziológiai receptorain keresztül valósul meg. Mindkét hatóanyag esetén ismertek a farmakológiai célponttól eltérő egyéb targetek, melyekhez különböző affinitással képesek kapcsolódni. Ezek a PDGFRA, PDGFRB, c-KIT, c-fms, M-CSF, DDR1, DDR2, CSF1R és SCF, melyek közvetítésével a direkt csonthatás érvényesülhet. Habár kezdetben számos kutatócsoport jutott olyan eredményre, hogy az onkohematológiai betegségek kezelésében használt tirozin-kináz gátlók, mint például az imatinib és a nilotinib, pozitív csontanyagcsere változásokat idézhetnek elő, a későbbi kiterjedtebb vizsgálatok azonban már nem minden esetben erősítették meg ezeket a megfigyeléseket.

Eredményeink alapján, a két vizsgált tirozin-kináz gátló hatására bekövetkező csontanyagcserét érintő változásokban, nem a korábban általunk is azonosított [87], és a csontanyagcseréhez szorosan köthető ismert jelátviteli útvonalak (mint például a Wnt

jelátviteli útvonala) játszanak szerepet. Ezért a jelen tanulmányban azonosított jelátviteli útvonala, top molekulák, valamint top upstream regulátorok új diagnosztikus és terápiás targeteket jelenthetnek a jövőben.

6.1. Az imatinib és a nilotinib kezelés hatására mért expressziós változások összegzése

A kezelések hatására tapasztalt expressziós változásokat vizsgálva elmondható, hogy az imatinib és a nilotinib pozitív irányba változtatta meg a génexpressziókat, vagyis inkább upregulálta a géneket, és az imatinib sokkal nagyobb mértékben hatott az expressziós változásokra.

Statisztikai számítások alapján, imatinib kezelést követően 358, nilotinib kezelést követően 21 statisztikailag szignifikáns expressziós változást mutató gént azonosítottunk a kontroll sejtekhez képest. Az imatinib és a nilotinib kezelés hatására azonosított, statisztikailag szignifikáns különbséget mutató 3 közös gén: a ZFP184, a Gm11225, és az AI593442.

A ZFP184 transzkripciót szabályozó folyamatokban vesz részt, és CLIC1 (klorid intracelluláris csatorna 1) kapcsolatán keresztül szerepe lehet az oszteoblaszt differenciálódásban (<https://reports.ingenuity.com> , <http://innatedb.com>) [88]. A Gm11225 (3-hidroxi-izobutirát dehidrogenáz pszeudogén) és AI593442 (C11orf87, kromoszóma 11 nyitott leolvasási keret 87) biológiai szerepét a csontanyagcserében még nem erősítették meg.

6.2. Az imatinibbel és a nilotinibbel kezelt sejtekben azonosított jelátviteli útvonala

6.2.1. Az imatinibbel és a nilotinibbel kezelt sejtekben azonosított GABA jelátvitel

Mindkét hatóanyag esetén a top kanonikus útvonala között szerepel a GABA receptor jelátviteli útvonala, melynek erősödése támogathatja a csonttömeg növekedést okozó biológiai folyamatokat. Kísérletek bizonyítják, hogy a csontban erős GABA rendszer található és a GABA neurotranszmitter jelet továbbító GABA receptorok jelen vannak az oszteoblasztokon és a mezenchimális sejteken, melyeknek szerepük lehet a remodeling során a sejtproliferációban és differenciálódásban [89-91]. A vizsgálatok során a receptor

család 4 tagjának (GABRQ, GABRB1, GABRG3 és GABBR2) megnövekedett génexpresszióját detektáltuk. A GABA receptorok közvetítésével az oszteoblasztok kulcsfontosságú differenciálódási markerei, mint a csont morfogenetikus protein 2 (BMP2) és az oszteokalcin egyaránt fokozott aktivációt mutat. Azonban az azonosított *GABBR2* gátolja az alkalikus foszfatáz aktivitást és a kalcium akkumulációt mezenchimális sztróma sejtekben [92], és csökkenti a BMP2, az oszteokalcin és az oszterix expressziót [92]. A kalcium akkumulációra és az ALP bioszintézisre kifejtett hatásuk miatt, a GABABR antagonisták használatát egyes kutatók előnyösnek tartanak a csont átépüléssel járó betegségek kezelésében [90]. A GABAR jelátvitelt bizonyos csontbetegségek kezelésének lehetséges targetjének tekintik [89, 91]. A GABA receptor jelátviteli útvonal oszteoblasztogenezist stimuláló hatása [89] miatt, növelheti a csonttömeg sűrűségét [89]. A remodeling során ez a jelátviteli folyamat részt vehet a csontsejt proliferációban, és differenciálódásban. A funkcionális GABA B receptorok úgy tűnik, hogy túlnyomó részt az oszteoblasztok által fejeződnek ki inkább és nem az oszteoklasztok által a remodeling és a szkeletogenezis során [90, 91]. A bemutatott eredmények alapján is látszik, hogy a GABA jelátvitel milyen sok kapcsolódási ponton érinti a csontsejtek működését, amely útvonalat mindkét hatóanyag szignifikánsan befolyásolta.

6.2.2. Az imatinibbel kezelt sejtekben azonosított jelátviteli rendszerek

6.2.2.1. Reelin jelátviteli útvonal

Az imatinibbel kezelt sejtekben a legjelentősebben ($-\log(p\text{-érték}) = 2,61E00$) változott útvonal a Reelin jelátviteli útvonal. Ez elsősorban a szinapszisok képződésében és a neurodegenerációban vesz részt. GWAS vizsgálatok során igazolták, hogy a reelin kódoló RELN gén variánsa összefügg az abnormális csont remodelinggel járó otoszklerózis kialakulásával [53]. A Reelin képes a nagyon kis denzitású lipoprotein receptorához kapcsolódni (VLDLR), mely kísérletünkben a top upstream regulátorok között szerepel. Így létrehoz egy szignalizációs komplexet (Reelin/VLDLR/ApoER2/Dab1), amelynek lehetséges szerepe az oszteoblasztok működésében még nem tisztázott. Azonban az egyes molekulakomponenseit kódoló gének szignifikánsan megnövekedett kifejeződését tapasztaltuk imatinib kezelést követően.

6.2.2.2. Zsírsvav aktivációs jelátviteli útvoval

A zsírsvav aktivációs jelátviteli útvoval a megfelelő zsírsvav és lipid bioszintézis biztosításával hozzájárulhat a csontvelősejt éréséhez és fejlődéséhez, mivel a csonttömeg nagy részét zsír teszi ki. A zsírok fontos szerepet játszanak a csontok újjáépülésében és a csontok megfelelő mechanikai tulajdonságainak megtartásában.

6.2.2.3. Szerotonin receptor jelátviteli útvoval

A tanulmányunk bemutatta, azt is, hogy az imatinib kezelés szignifikáns változást okozott a szerotonin receptor jelátviteli útvovalhoz tartozó gének mRNS expressziójában. A szerotonin (5-hidroxitriptamin, 5-HT) receptorok számos típusa megtalálható a csontsejteken (oszteoblaszt, oszteocita, oszteoklaszt), beleértve a vizsgálataink során is azonosított az 5-HT1 és 5-HT2 receptorokat [93-96]. Ezeken kívül a szerotonin receptorok más osztályaiban tartozó 5-HT5A receptort kódoló HTR5A gén upregulálódását is mértük. Irodalmi adatok alapján a szerotonin szabályozó szerepet tölt be a csontrendszerben.

A szerotonin molekula szintézise két különböző génhez is kötődhet. Ha a szintézis nem a központi idegrendszerben történik, akkor hormonként viselkedik és gátolja a csontépítést. Ezzel szemben, ha a központi idegrendszerben szintetizálódik, akkor neurotranszmitterként viselkedve erős pozitív hatást fejt ki a csonttömegre, elősegíti a csontépítést és viaszorítja a reszorpciót [97]. Több tanulmány is megerősíti a szerotonin által közvetített csonthatásokat [98], és a szerotonin jelátvitel összetett szerepét a csontsejteken [98]. Néhány tanulmány a szerotonin közvetlen stimuláló hatásáról számol be a csontépítésért felelős jelátviteli útvovalak vonatkozásában, míg mások a szerotonin gátló hatását írták le. A szerotonin jelátvitel hatása a csont reszorpciós útvovalakra szintén összetett, és függ a jelen lévő szerotonin koncentrációtól [99]. Habár, napjainkban a szerotonerg útvoval kapcsolata a csont metabolikus folyamataival még részleteiben nem ismert, egyes kutatások szerint a szerotonin hatását bizonyos csontbetegségek kezelésében, mint például az oszteoporózis, a jövőben hasznosítani lehetne [97].

6.2.3. A nilotinibbel kezelt sejtekben azonosított jelátviteli rendszerek

6.2.3.1. EIF2 jelátviteli útvonal

Nilotinib hatására a legerőteljesebb változást ($-\log(p\text{-érték})=5,27E00$) az EIF2 jelátviteli útvonal mutatta. A többszörös polipeptid alegységeket tartalmazó eIF molekulák, a fehérjeszintézis kezdő lépéséhez szükségesek. Az EIF2 GTP-kötő fehérjeként szabályozza, illetve elindítja a mRNS transzlációt. A csontépítéshez hozzájárulhat azáltal, hogy a foszforilált eIF2 α elősegíti az oszteoblaszt sejtek differenciálódásában és a csontépítésben fontos szerepet játszó aktiváló transzkripciós faktor 4 (ATF4) transzkripciós faktor transzlációját [100-102], amely a Wnt/ β -katenin útvonallal áll szoros kapcsolatban. Továbbá a foszforilált eIF2 α és downstream regulátorai részt vesznek az oszteoblaszt sejtek vírusfertőzés vagy tápanyag-hiány miatt kialakuló endoplazmatikus retikulum stressz válaszában, melyek módosítják a remodeling és a csontképződés markereinek transzkripciós aktivitását [100-102]. Nem megfelelő működése megváltoztathatja a sejt fehérjekészletének szintézisét és a sejtek túlélését (<https://reports.ingenuity.com>).

6.2.3.2. NANOG génhez rendelt útvonalak

A nilotinib hatására megváltozó NANOG homeobox gén az IPA szoftveres analízis alapján több szabályozási útvonal kulcseleme (embrionális őssejt differenciálódás szív sejt vonal irányba, az embrionális őssejtek transzkripciót szabályozó hálózata, Oct4 szerepe az emlős embrionális őssejt pluripotenciában). Ebben a három jelátvitelben részt vevő Oct4, SOX2, NANOG általában együtt fejtik ki hatásukat, és olyan géneket aktiválnak, melyek részt vesznek pluripotencia aktiválásában, önmegújuló mechanizmusokban. Kísérleteinkben ezt a három útvonalat a NANOG gén reprezentálja, amely a primer csontvelői mezenchimális őssejt csontsejt irányú elköteleződését és a csontszöveti regenerációt vezérli. Továbbá, összeköttetést biztosít a BMP kaszkáddal a SMAD1 fehérjéhez való közvetlen kötődésével [103].

6.3. Az imatinib és nilotinib kezelés hatására azonosított top upstream regulátorok és top molekulák

Az útvonalelemzések során az imatinibnél és a nilotinibnél azonosított top upstream regulátorokat (FREM2, GLDN, GRIP1, NRCAM, VLDLR ; ACVR1B, ACVR1C, FAAH, MARCH7, RAD23B) az IPA szoftver a változások minősége alapján határozta meg. Az azonosított top upstream regulátorok közül több esetben is ismertek adatok a csontanyagcserével összefüggésben.

A kezelések hatására legérzékenyebb molekulákat (imatinibbel kezelt csoportnál azonosított top molekulák: STXBP5L, GDF10, HYDIN, NYAP2, AQP9, CSMD1, MYO3B, RELN, Eda, SLITRK5 ; nilotinibbel kezelt csoportnál azonosított top molekulák: RPS23, ZFP184, EDNRB, DKK4, GABRB1, RPL17, KLHL41, NANOG, RPL39) viszont az expressziós változások mértéke alapján választotta ki a szoftver.

Az IPA szoftver használatával, az imatinibbel és a nilotinibbel kezelt sejtekben azonosított top upstream regulátorok és top molekulák rendkívül sokféle biológiai folyamatban vesznek részt, és több a csontanyagcserében is érintett.

6.3.1. Top upstream regulátorok

Az imatinib kezelés hatására azonosított top upstream regulátorok közül a VLDLR a koleszterin szint szabályozásán keresztül hatással lehet a csont ásványianyag-tartalomra [63], szabályozza a zsírsavakat, melyek fontos szerepet játszanak a csontok újjáépülésében és a csontok megfelelő mechanikai tulajdonságainak megtartásában. A VLDLR glikoproteinekhez is kötődik, melyek számos tagja szabályozza a csontanyagcserét.

A nilotinib jelentősen növelte az aktív A receptorok expresszióját. Az azonosított ACVR1B és ACVR1C aktív A receptorok transzmembrán szerin/treonin-kinázok, amik a TGF- β útvonal elemei. Az 1-es és 2-es típusú receptorok heterotrimerikus komplexet alkotnak. A komplexben az 1-es típusú receptor az aktív jel downstream továbbítójaként hat és foszforilálja a SMAD fehérjéket. Az aktív jelátvitelnek jól ismert szerepe van a csont homeosztázisban [64]. Aktív hat a proliferációra, differenciálódásra és a csontsejtek aktivitására. Továbbá képesek befolyásolni a csont turnover-t, csonttömeget és a törési kockázatot [64].

Továbbá a nilotinib kezelést követően azonosított FAAH upstream regulátor szerepet játszik a proliferációban, sejt életképességben. Részt vesz a zsírsav bioszintézisben és metabolizmusban, a lipid metabolizmusban és modifikációban. A zsírsavamidok hatással vannak az oszteoblasztokra és az oszteoklasztokra, stimulálják a csontépítést és gátolják a reszorpciót [65]. Ezen kívül számos csontanyagcserére gyakorolt közvetett hatása is ismert.

6.3.2. Top molekulák

Az imatinib és nilotinib kezelést követően az STXBP5L (logFC=4,40) és az RPS23 (logFC=3,45) gének voltak a legérzékenyebbek, a logFC értékük alapján.

Az STXBP5L vezikula transzportban és exocitózisban vesz részt (<http://www.genecards.org>). Továbbá részt vesz a fehérje szekréció szabályozásában, a fehérje transzportban, glükóz homesztázisban és inzulin szekréció szabályozásában (<https://reports.ingenuity.com>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

Az imatinibbel kezelt sejtekben a második legupreguláltabb molekula a GDF10 (logFC=4,33) volt. A GDF10, más néven csont morfogénikus fehérje 3B (BMP3b), a TGF β szupercsalád tagja. A GDF10 részt vesz szkeletális morfogenezisben, az oszteoblaszt differenciálódás szabályozásában, valamint a csontvázrendszer fejlődésében (<https://reports.ingenuity.com>, <http://www.genecards.org>). Az ismert csont morfogénikus fehérjéktől eltérően a GDF10 negatív szabályozója a csont ásványianyag-tartalomnak [104].

A nilotinib kezelést követően azonosított RPS23 gén egy citoplazmában található riboszomális fehérjét kódol, ami a 40S alegység egyik komponense (<https://reports.ingenuity.com>, <http://www.genecards.org>). Szerepe a csontanyagcserében jelenleg nem ismert.

A szintén nilotinib kezelést követően azonosított NANOG fontos szerepet játszik a csontépítésben törés vagy akár csontműtét után is [85].

Összességében, az általunk vizsgált két tirozin-kináz gátló az oszteoblaszt sejtekre gyakorolt hatásai eredményeként, módosíthatják azok működését. Habár a vizsgálataink során azonosított jelátviteli útvonalak (pl: Reelin jelátviteli útvonal, GABA receptor jelátvitel, Szerotonin receptor jelátvitel, EIF2 jelátvitel) és gének (pl: RELN, ACVR1C,

GRIP1, VLDLR, FAAH, GABRB1, RPL17) jelentős része az idegrendszerrel áll szorosabb kapcsolatban, számos vizsgálat bizonyítja a csontanyagcsere szabályozásában betöltött szerepüket is. A kezdeti kutatási eredményektől eltérően, az újabb kutatási eredményeket, valamint a saját kutatási eredményeinket figyelembe véve elmondható, hogy a tirozin-kináz gátlóknak nincs egyértelmű pozitív hatása a csontanyagcserére. Inkább csak módosítják azt, és ezáltal alkalmazásuk során komplex módon változtathatják meg a csontszövet élettani folyamatait. Az oszteoblaszt sejt kultúrákon végzett vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy a vizsgált két tirozin-kináz gátló valóban hat az oszteoblaszt sejt működésre. Mindkét általunk vizsgált hatóanyag változást idézett elő a csontanyagcserében, de a háttérben lejátszódó folyamatok különbözőek. Vizsgálataink során, imatinibbel és a nilotinibbel kezelt oszteoblaszt sejt kultúrákban megfigyelt génexpressziós változások, alátámasztják a korábbi in vivo csontanyagcserét érintő klinikai megfigyeléseket, rávilágítva több kandidáns gén és a csontsejtek működését szabályozó jelátviteli kaszkád lehetséges szerepére, azonban jelenleg a megfigyeléseink klinikai jelentőségének meghatározása további kutatásokat igényel.

7. Következtetések

Több klinikai tanulmány igazolta, hogy a tirozin-kináz gátlók alkalmazása során, komplex módon változik a csontszövet élettana. Az oszteoblaszt sejtekre gyakorolt hatásukat saját kísérleti eredményeink is bizonyítják.

Munkánk során, a SOLiD új generációs RNS szekvenálási technikán alapuló teljes transzkriptóma analízis segítségével, elsőként vizsgáltuk, a két széles körben alkalmazott tirozin-kináz gátló hatóanyag, az imatinib és a nilotinib oszteoblaszt sejtek génexpressziójára gyakorolt hatását a mintákban jelen lévő összes mRNS azonosításával. Mindkét hatóanyag esetében meghatároztuk a legjelentősebb útvonalakat, upstream regulátorokat és top molekulákat. Adataink számos gén és jelátviteli kaszkád potenciális szerepét jelezték, melyek talán szabályozzák az oszteoblaszt sejtek működését. A munkánk által megszerzett tudás a két hatóanyag hatásmechanizmusának mélyebb megértését segíti, amely a jövőben esetleg új terápiás targeteket is kijelölhet. Az újabb kutatási eredményeket (beleértve a saját eredményeinket is) figyelembe véve elmondható, hogy az onkohematológiai betegségek kezelése során alkalmazott tirozin-kináz gátlóknak nincs egyértelmű pozitív hatása a csontanyagcserére, és csonthatásaikban a csontanyagcseréhez szorosan köthető ismert jelátviteli útvonalak, mint például az általunk is feltételezett Wnt jelátviteli útvonal, nem játszanak szerepet.

Eredményeink alapján a két hatóanyag eltérően hat az oszteoblaszt sejtek működésére és az imatinib hatása hangsúlyosabb. Kísérleteink alapján tapasztalt imatinib és nilotinib eltérő hatásának magyarázata valószínűleg az lehet, hogy az imatinib több tirozin-kináz receptort képes gátolni, míg az imatinibnél jóval szelektívebb nilotinib a tirozin-kináz receptorok többségére nem vagy csak alig hat.

Vizsgálataink során a tirozin-kináz gátló kezeléseket egy sejt kultúrán (MC3T3-E1 oszteoblaszt sejt kultúra) végeztük el. A bemutatott génexpressziós eredmények megerősítéséhez további RT-PCR vizsgálatok, valamint funkcionális tesztek szükségesek. A biológiailag szignifikáns cél molekulák sejtszintű szabályozó mechanizmusainak mélyebb feltérképezéséhez pedig további sejt vonalakon végzett vizsgálatokra lenne szükség. Mivel a tirozin-kináz gátló kezelések egyre több beteget érintenek, illetve hosszú évtizedekig, vagy akár élethosszig is tarthatnak, indokolt a hatásuk molekuláris hátterének még részletesebb megismerése.

8. Összefoglalás

Az onkohematológiai betegségek kezelésében elterjedten használt BCR-ABL specifikus tirozin-kináz gátlókról (mint például az imatinib és a nilotinib), megjelenésüket követően rövid idővel a szakirodalomban ismertetett vizsgálatok jelentős része arról számolt be, hogy pozitív hatással vannak a csontanyagcserére. De a folyamatok pontos hatásmechanizmusairól és a jelátviteli utak működésének változásairól kevés ismeret állt rendelkezésre.

Mivel a kezelések egyre több beteget érintenek, illetve hosszú évtizedekig, vagy akár élethosszig is tarthatnak, indokoltnak tartottuk ezen mechanizmusok molekuláris hátterének mélyebb megismerését. Ezért, két széles körben alkalmazott BCR-ABL specifikus tirozin-kináz gátló hatóanyagnak, az imatinibnek és nilotinibnek, megvizsgáltuk az egér oszteoblaszt sejtek génkifejeződéseire gyakorolt hatását a teljes transzkriptom szintjén *in vitro* rendszerben. Ez volt az első olyan vizsgálat, ahol a csontképzésben szerepet játszó oszteoblasztok teljes mRNS készletét és annak a kezelés hatására bekövetkezett expressziós változását analizálták. A korábbi tanulmányokban megjelent adatok, a tirozin-kináz gátlók alkalmazását követően, csak a csontszövet legjellemzőbb markereinek génkifejeződésére fókuszáltak. Azonban komplex, sejtszintű transzkripciós mintázatbeli elemzés a csontanyagcsere vonatkozásában ez idáig nem történt.

Tanulmányunkban összefoglalásra kerültek a tirozin-kináz gátlók csontanyagcserét érintő kutatásainak eddigi eredményei, beleértve a nemzetközi eredményeket és a saját kutatási eredményeinket is. A tirozin-kináz gátlók csontanyagcserét befolyásoló hatásairól elsőként készítettünk a hazai szakirodalomban hiánypótló, átfogó irodalmi áttekintést. A jelenlegi kutatási eredményeket összegezve elmondható, hogy a tirozin-kináz gátlóknak nincs egyértelmű pozitív hatása a csontanyagcserére. Inkább csak módosítják azt, és ezáltal alkalmazásuk során komplex módon változtathatják meg a csontszövet élettani folyamatait. Az imatinibbel és a nilotinibbel kapcsolatban, a szakirodalomban megjelent csontanyagcseréhez kapcsolódó alapkutatási eredmények, humán klinikai megfigyelések és a saját *in vitro* oszteoblaszt sejtkultúrákon végzett kísérleteink eredményei alapján, az imatinib és a nilotinib csontsejtekre gyakorolt hatása különböző, valamint függ az alkalmazott hatóanyag-koncentrációtól, a sejtek érettségi állapotától, illetve az általuk kötött receptor tirozin-kináz útvonalak megoszlási arányától. Saját kutatási eredményeink

elsősorban, a lassabban kialakuló másodlagos génaktivitásokban bekövetkező változásokat tükrözik. Vizsgálataink során mindkét hatóanyag esetében meghatároztuk a szignifikáns expressziós különbségeket mutató géneket, azonosítottuk a top jelátviteli rendszereket, az upstream regulátor géneket és a top molekulákat. Kiemelt figyelmet fordítottunk a hatóanyagok feltételezett csontanyagcsere modifikáló hatásainak értelmezésére és magyarázatára.

Kutatásunk az onkohematológiai betegségek kezelésében széles körben alkalmazott imatinib és nilotinib hatásmechanizmusainak mélyebb megértését szolgálta, mely tudás esetleg a jövőben új terápiás targeteket is kijelölhet.

9. Summary

BCR-ABL specific tyrosine kinase inhibitors (for example imatinib and nilotinib) are widely used drugs for the treatment of certain oncohematological diseases. Shortly after their appearance a lot of literature described studies show that tyrosine kinase inhibitors have positive effects on bone metabolism. But the exactly mechanism of action of these process and changes in the function of signaling pathways are poorly understood.

Since these treatments are being given to more and more patients, and the therapy takes decades or lasts even lifelong, it is justifiable to obtain more detailed knowledge of the molecular background of these mechanisms. Therefore, we investigated the effects of two widely used BCR-ABL specific tyrosine kinase inhibitors (imatinib and nilotinib) on gene expression of murine osteoblasts in in vitro system by whole transcriptome analysis. This was the first study to observe the complete mRNA pattern of osteoblasts by whole transcriptome analysis and analyse the expression changes. Thus, it was possible to demonstrate the top canonical pathways and upstream regulators that were affected in osteoblast cells by these compounds. Previous studies have reported expression data in response to tyrosine kinase inhibitors only of strictly bone-related genes.

In our study we summarized the tyrosine kinase inhibitors effects on bone metabolism, based on international results and our own results. We firstly prepared national comprehensive literature review in connection with effects of the tyrosine kinase inhibitors on bone metabolism. Summarizing the research results we can state that tyrosine kinase inhibitors have no unequivocal positive effects on bone metabolism. Nevertheless tyrosine kinase inhibitors can alter bone physiology in a complex manner by influence in osteoblast and osteoclast function. Based on the result of preliminarily studies, human clinical observation and in our in vitro experiments, the effects of imatinib and nilotinib on osteoblast function depend on the concentration of the utilized tyrosine kinase inhibitors, the maturation stage of the osteoblasts and the distribution of various tyrosine kinase inhibitor-targeted receptors on cells. Our results reflect the extended secondary expression changes. During our experiments, in case of both drugs, genes showing significantly changed mRNA expression levels, top signaling pathways, upstream regulators and top molecules were defined. We paid particular attention to interpretation of hypothesized bone metabolism modification effects of these drugs.

Our study supports the understanding of mechanism of action of BCR-ABL specific tyrosine kinase inhibitor imatinib and nilotinib. In the future this outcome of this research may contribute to identifying novel targets for the treatment of metabolic bone diseases.

10. Irodalomjegyzék

1. Vandyke K, Fitter S, Drew J, Fukumoto S, Schultz CG, Sims NA, Yeung DT, Hughes TP, Zannettino ACW. (2013) Prospective Histomorphometric and DXA Evaluation of Bone Remodeling in Imatinib-Treated CML Patients: Evidence for Site-Specific Skeletal Effects. *J Clin Endocrinol Metab*, 98: 67-76.
2. Tibullo D, Barbagallo I, Giallongo C, La Cava P, Branca A, Conticello C, Stagno F, Chiarenza A, Palumbo GA, Di Raimondo F. (2012) Effects of second-generation tyrosine kinase inhibitors towards osteogenic differentiation of human mesenchymal cells of healthy donors. *Hematol Oncol*, 30: 27-33.
3. Jonsson S, Hjorth-Hansen H, Olsson B, Wadenvik H, Sundan A, Standal T. (2012) Imatinib inhibits proliferation of human mesenchymal stem cells and promotes early but not late osteoblast differentiation in vitro. *J Bone Miner Metab*, 30: 119-123.
4. Fitter S, Dewar AL, Kostakis P, To LB, Hughes TP, Roberts MM, Lynch K, Vernon-Roberts B, Zannettino ACW. (2008) Long-term imatinib therapy promotes bone formation in CML patients. *Blood*, 111: 2538-2547.
5. Berman E, Nicolaides M, Maki RG, Fleisher M, Chanel S, Scheu K, Wilson BA, Heller G, Sauter NP. (2006) Altered bone and mineral metabolism in patients receiving imatinib mesylate. *N Engl J Med*, 354: 2006-2013.
6. Dib IE, Gallet M, Mentaverri R, Sevenet N, Brazier M, Kamel S. (2006) Imatinib mesylate (Gleevec (R)) enhances mature osteoclast apoptosis and suppresses osteoclast bone resorbing activity. *Eur J Pharmacol*, 551: 27-33.
7. Dewar AL, Farrugia AN, Condina MR, Bik To L, Hughes TP, Vernon-Roberts B, Zannettino ACW. (2006) Imatinib as a potential antiresorptive therapy for bone disease. *Blood*, 107: 4334.
8. Grey A, O'Sullivan S, Reid IR, Browett P. (2006) Imatinib Mesylate, Increased Bone Formation, and Secondary Hyperparathyroidism. *N Engl J Med*, 355: 2494-2495.
9. Jonsson S, Olsson B, Ohlsson C, Lorentzon M, Mellstrom D, Wadenvik H. (2008) Increased cortical bone mineralization in imatinib treated patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica*, 93: 1101-1103.
10. Tibullo D, Giallongo C, La Cava P, Berretta S, Stagno F, Chiarenza A, Conticello C, Palumbo GA, Di Raimondo F. (2009) Effects of imatinib mesylate in osteoblastogenesis. *Exp Hematol*, 37: 461-468.

11. O'Sullivan S, Lin JM, Watson M, Callon K, Tong PC, Naot D, Horne A, Aati O, Porteous F, Gamble G, Cornish J, Browett P, Grey A. (2011) The skeletal effects of the tyrosine kinase inhibitor nilotinib. *Bone*, 49: 281-289.
12. Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ. *Fundamentals of osteoporosis*. Academic Press, London, 2010.
13. Lakatos P, Takács I. *A Csontanyagcsere Betegségei*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2012.
14. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19: 5548-5557.
15. Wang C, Meng H, Wang X, Zhao C, Peng J, Wang Y. (2016) Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Osteoblasts and Adipocytes and its Role in Treatment of Osteoporosis. *Med Sci Monit*, 22: 226-233.
16. Lind M. (1996) Growth factors: Possible new clinical tools: A review. *Acta Orthop Scand*, 67: 407-417.
17. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. (1996) Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone*, 19: 1s-12s.
18. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. (1993) Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res*, 8: S565-S572.
19. Wei Q, Pohl TLM, Seckinger A, Spatz JP, Cavalcanti-Adam EA. (2015) Regulation of integrin and growth factor signaling in biomaterials for osteodifferentiation. *Beilstein J Org Chem*, 11: 773-783.
20. Nimni ME. (1997) Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials*, 18: 1201-1225.
21. King WJ, Krebsbach PH. (2012) Growth factor delivery: How surface interactions modulate release in vitro and in vivo. *Adv Drug Deliv Rev*, 64: 1239-1256.
22. Yang J, Andre P, Ye L, Yang Y-Z. (2015) The Hedgehog signalling pathway in bone formation. In *J Oral Sci*, 7: 73-79.
23. Nozawa YI, Lin C, Chuang P-T. (2013) Hedgehog signaling from the primary cilium to the nucleus: an emerging picture of ciliary localization, trafficking and transduction. *Curr Opin Genet Dev*, 23: 429-437.
24. Lerner UH, Ohlsson C. (2015) The WNT system: background and its role in bone. *J Intern Med*, 277: 630-649.

25. Yavropoulou MP, Yovos JG. (2007) The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones (Athens)*, 6: 279-294.
26. Regan J, Long F. (2013) Notch Signaling and Bone Remodeling. *Curr Osteoporos Rep*, 11: 126-129.
27. Chen S, Lee BH, Bae Y. (2014) Notch signaling in Skeletal Stem Cells. *Calcif Tissue Int*, 94: 68-77.
28. Zanotti S, Canalis E. (2010) Notch and the skeleton. *Mol Cell Biol*, 30: 886-896.
29. Kopan R. (2012) Notch signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4:
30. Kopan R, Ilagan MX. (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137: 216-233.
31. Guo B, McMillan BJ, Blacklow SC. (2016) Structure and function of the Mind bomb E3 ligase in the context of Notch signal transduction. *Curr Opin Struct Biol*, 41: 38-45.
32. Andersen P, Uosaki H, Shenje L, Kwon C. (2012) Non-Canonical Notch Signaling: Emerging Role and Mechanism. *Trends Cell Biol*, 22: 257-265.
33. Wu M, Chen G, Li Y-P. (2016) TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res*, 4: 16009.
34. Chen G, Deng C, Li Y-P. (2012) TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Int J Biol Sci*, 8: 272-288.
35. Sánchez-Duffhues G, Hiepen C, Knaus P, Ten Dijke P. Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone*, 80: 43-59.
36. Guo X, Wang X-F. (2009) Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell Res*, 19: 71-88.
37. Feng XH, Derynck R. (2005) Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21: 659-693.
38. Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M. (2009) The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1792: 954-973.
39. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002) The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, 298: 1912-1934.
40. Blume-Jensen P, Hunter T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411: 355-365.
41. Berki T, Boldizsár F, Szabó M, Talabér G, Varcza Z. (2011) Jelátvitel (Orvosi Biotechnológia). Pécsi Tudományegyetem, Pécs, 2011.

42. György V. Sejtbiológia. Medicina, Budapest, 2009: 444.
43. Cohen MH, Moses ML, Pazdur R. (2002) Gleevec™ for the treatment of chronic myelogenous leukemia: U.S. Food and Drug Administration regulatory mechanisms, accelerated approval, and orphan drug status. *Oncologist*, 7: 390-392.
44. Kirschner Gy, Balla B, Kósa JP, Horváth P, Kövesdi A, Lakatos G, Takács I, Nagy Zs, Tóbiás B, Árvai K, Lakatos P. (2016) Az onkohematológiai betegségek kezelésében használt tirozin-kináz gátló imatinib és nilotinib csonthatásainak irodalmi áttekintése és a saját kutatási eredmények bemutatása. *Orv Hetil*, 157: 1429-1437.
45. Benito R, Lumbreras E, Abaigar M, Gutierrez NC, Delgado M, Robledo C, Garcia JL, Rodriguez-Vicente AE, Canizo MC, Rivas JM. (2012) Imatinib therapy of chronic myeloid leukemia restores the expression levels of key genes for DNA damage and cell-cycle progression. *Pharmacogenet Genomics*, 22: 381-388.
46. Vandyke K, Fitter S, Dewar AL, Hughes TP, Zannettino AC. (2010) Dysregulation of bone remodeling by imatinib mesylate. *Blood*, 115: 766-774.
47. O'Sullivan S, Naot D, Callon K, Porteous F, Horne A, Wattie D, Watson M, Cornish J, Browett P, Grey A. (2007) Imatinib promotes osteoblast differentiation by inhibiting PDGFR signaling and inhibits osteoclastogenesis by both direct and stromal cell-dependent mechanisms. *J Bone Miner Res*, 22: 1679-1689.
48. Wihlidal P, Karlic H, Pfeilstocker M, Klaushofer K, Varga F. (2008) Imatinib mesylate (IM)-induced growth inhibition is associated with production of spliced osteocalcin - mRNA in cell lines. *Leuk Res*, 32: 437-443.
49. Fierro F, Illmer T, Jing D, Schleyer E, Ehninger G, Boxberger S, Bornhauser M. (2007) Inhibition of platelet-derived growth factor receptor beta by imatinib mesylate suppresses proliferation and alters differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Prolif*, 40: 355-366.
50. Berman E, Girotra M, Cheng C, Chanel S, Maki R, Shelat M, Strauss HW, Fleisher M, Heller G, Farooki A. (2013) Effect of long term imatinib on bone in adults with chronic myelogenous leukemia and gastrointestinal stromal tumors. *Leuk Res*, 37: 790-794.
51. O'Sullivan S, Horne A, Wattie D, Porteous F, Callon K, Gamble G, Ebeling P, Browett P, Grey A. (2009) Decreased Bone Turnover Despite Persistent Secondary

Hyperparathyroidism during Prolonged Treatment with Imatinib. *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 1131-1136.

52. Lawrence L. (2013) Long-Term Treatment With Imatinib Affected Bone Mineral Density. *Cancer Network*.

53. Schrauwen I, Ealy M, Huentelman MJ, Thys M, Homer N, Vanderstraeten K, Fransen E, Corneveaux JJ, Craig DW, Claustres M, Cremers C, Dhooge I, Van de Heyning PV, Vincent R, Offeciers E, Smith RJ, Van Camp G. (2009) A Genome-wide Analysis Identifies Genetic Variants in the RELN Gene Associated with Otosclerosis. *Am J Hum Genet*, 84: 328-338.

54. Chen H, Kolman K, Lancilotti N, Nerney M, Hays E, Robson C, Chandar N. (2012) P53 and MDM2 are involved in the regulation of osteocalcin gene expression. *Exp Cell Res*, 318: 867-876.

55. Chim SM, Qin A, Tickner J, Pavlos N, Davey T, Wang H, Guo Y, Zheng MH, Xu J. (2011) EGFL6 Promotes Endothelial Cell Migration and Angiogenesis through the Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase. *J Biol Chem*, 286: 22035-22046.

56. Green J, Nusse R, Van Amerongen R. (2014) The Role of Ryk and Ror Receptor Tyrosine Kinases in Wnt Signal Transduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6: a009175.

57. Cho HY, Jung JY, Park H, Yang JY, Jung S, An JH, Cho SW, Kim SW, Kim SY, Kim JE, Park YJ, Shin CS. (2014) In vivo deletion of CAR resulted in high bone mass phenotypes in male mice. *J Cell Physiol*, 229: 561-571.

58. Li WF, Hou SX, Yu B, Jin D, Ferec C, Chen JM. (2010) Genetics of osteoporosis: perspectives for personalized medicine. *Per Med*, 7: 655-668.

59. (2012) Deleting Mef2c in mice increases bone mass. *BoneKEy Rep*, 1: 61.

60. Karasik D, Cheung CL, Zhou Y, Cupples LA, Kiel DP, Demissie S. (2012) Genome-wide association of an integrated osteoporosis-related phenotype: is there evidence for pleiotropic genes? *J Bone Miner Res*, 27: 319-330.

61. Fauquier L, Duboe C, Jore C, Trouche D, Vandel L. (2008) Dual role of the arginine methyltransferase CARM1 in the regulation of c-Fos target genes. *Faseb J*, 22: 3337-3347.

62. Edwards CM, Mundy GR. (2008) Eph receptors and ephrin signaling pathways: a role in bone homeostasis. *Int J Med Sci*, 5: 263-272.

63. Li S, Guo HB, Liu YS, Wu F, Zhang HB, Zhang ZM, Xie ZJ, Sheng ZF, Liao EY. (2015) Relationships of serum lipid profiles and bone mineral density in postmenopausal Chinese women. *Clin Endocrinol*, 82: 53-58.
64. Lotinun S, Scott Pearsall R, Horne WC, Baron R. (2012) Activin receptor signaling: A potential therapeutic target for osteoporosis. *Curr Mol Pharmacol*, 5: 195-204.
65. Bab I, Smoum R, Bradshaw H, Mechoulam R. (2011) Skeletal lipidomics: regulation of bone metabolism by fatty acid amide family. *Br J Pharmacol*, 163: 1441-1446.
66. Shinohara M, Nakamura M, Masuda H, Hirose J, Kadono Y, Iwasawa M, Nagase Y, Ueki K, Kadowaki T, Sasaki T, Kato S, Nakamura H, Tanaka S, Takayanagi H. (2012) Class IA phosphatidylinositol 3-kinase regulates osteoclastic bone resorption through protein kinase B-mediated vesicle transport. *J Bone Miner Res*, 27: 2464-2475.
67. Terauchi Y, Tsuji Y, Satoh S, Minoura H, Murakami K, Okuno A, Inukai K, Asano T, Kaburagi Y, Ueki K, Nakajima H, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Sekihara H, Yin Y, Barrett JC, Oda H, Ishikawa T, Akanuma Y, Komuro I, Suzuki M, Yamamura K, Kodama T, Suzuki H, Yamamura K, Kodama T, Suzuki H, Koyasu S, Aizawa S, Tobe K, Fukui Y, Yazaki Y, Kadowaki T. (1999) Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat Genet*, 21: 230-235.
68. Terauchi Y, Matsui J, Kamon J, Yamauchi T, Kubota N, Komeda K, Aizawa S, Akanuma Y, Tomita M, Kadowaki T. (2004) Increased Serum Leptin Protects From Adiposity Despite the Increased Glucose Uptake in White Adipose Tissue in Mice Lacking p85 α Phosphoinositide 3-Kinase. *Diabetes*, 53: 2261.
69. Ueki K, Fruman DA, Brachmann SM, Tseng YH, Cantley LC, Kahn CR. (2002) Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol Cell Biol*, 22: 965-977.
70. Chanprasertyothin S, Saetung S, Rajatanavin R, Ongphiphadhanakul B. (2010) Genetic variant in the aquaporin 9 gene is associated with bone mineral density in postmenopausal women. *Endocrine*, 38: 83-86.
71. Aharon R, Bar-Shavit Z. (2006) Involvement of aquaporin 9 in osteoclast differentiation. *J Biol Chem*, 281: 19305-19309.
72. Kraus DM, Elliott GS, Chute H, Horan T, Pfenninger KH, Sanford SD, Foster S, Scully S, Welcher AA, Holers VM. (2006) CSMD1 is a novel multiple domain

complement-regulatory protein highly expressed in the central nervous system and epithelial tissues. *J Immunol*, 176: 4419-4430.

73. Miyauchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, Sakamoto A, Iwasaki R, Hoshi H, Miyamoto K, Hao W, Yoshida S, Morioka H, Chiba K, Kato S, Tokuhisa T, Saitou M, Toyama Y, Suda T, Miyamoto T. (2010) The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis. *J Exp Med*, 207: 751-762.

74. Lawson KA, Teteak CJ, Gao J, Li N, Hacquebord J, Ghatan A, Zielinska-Kwiatkowska A, Song G, Chansky HA, Yang L. (2013) ESET histone methyltransferase regulates osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells during postnatal bone development. *FEBS Lett*, 587: 3961-3967.

75. Clines GA, Mohammad KS, Bao Y, Stephens OW, Suva LJ, Shaughnessy JD, Jr., Fox JW, Chirgwin JM, Guise TA. (2007) Dickkopf homolog 1 mediates endothelin-1-stimulated new bone formation. *Mol Endocrinol*, 21: 486-498.

76. Khodorova A, Montmayeur JP, Strichartz G. (2009) Endothelin receptors and pain. *J Pain*, 10: 4-28.

77. Guise TA, Yin JJ, Mohammad KS. (2003) Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases. *Cancer*, 97: 779-784.

78. Guise TA, Mohammad KS, Clines G, Stebbins EG, Wong DH, Higgins LS, Vessella R, Corey E, Padalecki S, Suva L, Chirgwin JM. (2006) Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res*, 12: 6213s-6216s.

79. Yin JJ, Mohammad KS, Kakonen SM, Harris S, Wu-Wong JR, Wessale JL, Padley RJ, Garrett IR, Chirgwin JM, Guise TA. (2003) A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 10954-10959.

80. Gerstenfeld LC, Einhorn TA. (2004) COX inhibitors and their effects on bone healing. *Expert Opin Drug Saf*, 3: 131-136.

81. Tarkka T, Sipola A, Jamsa T, Soini Y, Yla-Herttuala S, Tuukkanen J, Hautala T. (2003) Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. *J Gene Med*, 5: 560-566.

82. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, Bouxsein ML, Faugere MC, Guldberg RE, Gerstenfeld LC, Haase VH, Johnson RS, Schipani E, Clemens TL. (2007)

The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest*, 117: 1616-1626.

83. Armstrong VJ, Muzylak M, Sunters A, Zaman G, Saxon LK, Price JS, Lanyon LE. (2007) Wnt/beta-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha. *J Biol Chem*, 282: 20715-20727.

84. Hiramitsu S, Terauchi M, Kubota T. (2013) The Effects of Dickkopf-4 on the Proliferation, Differentiation, and Apoptosis of Osteoblasts. *Endocrinology*, 154: 4618-4626.

85. Bais M, McLean J, Sebastiani P, Young M, Wigner N, Smith T, Kotton DN, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. (2009) Transcriptional Analysis of Fracture Healing and the Induction of Embryonic Stem Cell-Related Genes. *PLoS One*, 4: e5393.

86. Rix U, Hantschel O, Duernberger G, Rix LLR, Planyavsky M, Fernbach NV, Kaupe I, Bennett KL, Valent P, Colinge J, Kocher T, Superti-Furga G. (2007) Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib, reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood*, 110: 4055-4063.

87. Horváth P, Balla B, Kósa JP, Tobiás B, Szili B, Kirschner Gy, Győri G, Kató K, Lakatos P, Takács I. (2016) Strong effect of SNP rs4988300 of the LRP5 gene on bone phenotype of Caucasian postmenopausal women. *J Bone Miner Metab*, 34: 79-85.

88. Yang JY, Jung JY, Cho SW, Choi HJ, Kim SW, Kim SY, Kim HJ, Jang CH, Lee MG, Han J, Shin CS. (2009) Chloride intracellular channel 1 regulates osteoblast differentiation. *Bone*, 45: 1175-1185.

89. Muhammad SI, Maznah I, Mahmud R, Zuki AZ, Imam MU. (2013) Upregulation of genes related to bone formation by gamma-amino butyric acid and gamma-oryzanol in germinated brown rice is via the activation of GABA(B)-receptors and reduction of serum IL-6 in rats. *Clin Interv Aging*, 8: 1259-1271.

90. Fujimori S, Hinoi E, Yoneda Y. (2002) Functional GABA(B) receptors expressed in cultured calvarial osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 293: 1445-1452.

91. Takahata Y, Takarada T, Hinoi E, Nakamura Y, Fujita H, Yoneda Y. (2011) Osteoblastic γ -Aminobutyric Acid, Type B Receptors Negatively Regulate Osteoblastogenesis toward Disturbance of Osteoclastogenesis Mediated by Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand in Mouse Bone. *J Biol Chem*, 286: 32906-32917.

92. Mentink A, Hulsman M, Groen N, Licht R, Dechering KJ, van der Stok J, Alves HA, Dhert WJ, Van Someren EP, Reinders MJT, Van Blitterswijk CA, De Boer J. (2013) Predicting the therapeutic efficacy of MSC in bone tissue engineering using the molecular marker CADM1. *Biomaterials*, 34: 4592-4601.
93. Westbroek I, Van Der Plas A, De Rooij KE, Klein-Nulend J, Nijweide PJ. (2001) Expression of serotonin receptors in bone. *J Biol Chem*, 276: 28961-28968.
94. Bliziotis MM, Eshleman AJ, Zhang XW, Wiren KM. (2001) Neurotransmitter action in osteoblasts: Expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. *Bone*, 29: 477-486.
95. Dai SQ, Yu LP, Shi X, Wu H, Shao P, Yin GY, Wei YZ. (2014) Serotonin regulates osteoblast proliferation and function in vitro. *Braz J Med Biol Res*, 47: 759-765.
96. Yadav VK, Ducy P, Karsenty G. (2010) Serotonin: a new player in the regulation of bone remodeling. *Medicographia*, 32: 357-363.
97. Ducy P, Karsenty G. (2010) The two faces of serotonin in bone biology. *J Cell Biol*, 191: 7-13.
98. Bliziotis M. (2010) Update in Serotonin and Bone. *J Clin Endocrinol Metab*, 95: 4124-4132.
99. Battaglini R, Fu J, Spate U, Ersoy U, Joe M, Sedaghat L, Stashenko P. (2004) Serotonin regulates osteoclast differentiation through its transporter. *J Bone Miner Res*, 19: 1420-1431.
100. Saito A, Ochiai K, Kondo S, Tsumagari K, Murakami T, Cavener DR, Imaizumi K. (2011) Endoplasmic Reticulum Stress Response Mediated by the PERK-eIF2 α -ATF4 Pathway Is Involved in Osteoblast Differentiation Induced by BMP2. *J Biol Chem*, 286: 4809-4818.
101. Hamamura K, Yokota H. (2007) Stress to endoplasmic reticulum of mouse osteoblasts induces apoptosis and transcriptional activation for bone remodeling. *FEBS Lett*, 581: 1769-1774.
102. Hirasawa H, Jiang C, Zhang P, Yang FC, Yokota H. (2010) Mechanical stimulation suppresses phosphorylation of eIF2 α and PERK-mediated responses to stress to the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett*, 584: 745-752.
103. Suzuki A, Raya A, Kawakami Y, Morita M, Matsui T, Nakashima K, Gaget FH, Rodriguez-Esteban C, Belmonte JCI. (2006) Nanog binds to Smad1 and blocks bone

morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 10294-10299.

104. Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, Cox K, Rosen V, Lyons KM. (2001) Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet*, 27: 84-88.

11. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

1. Kirschner Gy, Balla B, Horváth P, Kövesdi A, Lakatos G, Takács I, Nagy Zs, Tobiás B, Árvai K, Kósa JP, Lakatos P. (2016) Effects of imatinib and nilotinib on the whole transcriptome of cultured murine osteoblasts. *Mol Med Rep*, 14: 2025-2037.
2. Kirschner Gy, Balla B, Kósa JP, Horváth P, Kövesdi A, Lakatos G, Takács I, Nagy Zs, Tóbiás B, Árvai K, Lakatos P. (2016) Az onkohematológiai betegségek kezelésében használt tirozin-kináz gátló imatinib és nilotinib csonthatásainak irodalmi áttekintése és a saját kutatási eredmények bemutatása. *Orv Hetil* 157 (36): 1429-1437.
3. Horváth P, Balla B, Kósa JP, Tobiás B, Szili B, Kirschner Gy, Győri G, Kató K, Lakatos P, Takács I. (2016) Strong effect of SNP rs4988300 of the LRP5 gene on bone phenotype of Caucasian postmenopausal women. *J Bone Miner Metab*, 34: 79-85.

A disszertációtól független publikációk:

1. Árvai K, Horváth P, Balla B, Tobiás B, Kató K, Kirschner Gy, Klujber V, Lakatos P, Kósa JP. (2016) Next-generation sequencing of common osteogenesis imperfecta-related genes in clinical practice. *Sci Rep*, 6: 28417, 2016.
2. Lakatos P, Tóbiás B, Kósa JP, Halászlaki Cs, Balla B, Árvai K, Kirschner Gy, Putz Zs, Dank M, Takács I. (2016) Differenciál pajzsmirigyrákok molekuláris diagnosztikája: Hol tartunk 2016-ban?. *MBA*, 69:(2) pp. 98-103.
3. Szili B, Bakos B, Kató K, Kirschner Gy, Tóbiás B, Balla B, Horváth P. (2014) A D3-vitamin-kezelés különböző adagolási sémáinak összehasonlítása. *LAM KID* 4: 163-168, 2014.

13. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik hozzájárultak PhD tanulmányaim megvalósításához, és az évek során csiszoltak.

Külön köszönet családomnak, akik elindítottak a tanulás útján és a mai napig a céljaim elérésére biztatnak, és vőlegényemnek, Gergőnek, aki mindvégig mellettem állt és támogatott a PhD tanulmányaim során felmerült nehezebb időszakokban is.

Szeretném kifejezni köszönetemet és hálámat, Dr. Orosz László tanár úrnak, hogy időt szánt rám, meghallgatott és kedves, segítőkész tanácsaival utat mutatott a PhD tanulmányaim elkezdéséhez.

Külön köszönet témavezetőmnek, Dr. Lakatos Péter professzor úrnak, hogy bízott bennem és lehetőséget adott a PhD tanulmányok elvégzésére. Köszönöm, hogy türelemmel tanított. Hálás vagyok, hogy az évek során mindig szívesen segített, bármilyen kérdésemmel bizalommal fordulhattam hozzá, mindig gyors és segítőkész választ kaptam.

Köszönöm, Dr. Takács István doktor úrnak, hogy tanácsaival és fáradozásával segítette a tudományos munkám elindulását. Köszönöm, Dr. Balla Bernadettnek, hogy szakmai tudásával segítette és színvonalasabbá tette a szakirodalomban azóta megjelent közös cikkeinket. Köszönöm, Árvai Kristófnak, hogy kezdetektől fogva szívesen és örömmel mesélt munkájáról, melynek egy-két apró részletét érthetően és szemléletesen el is magyarázta.

Hálásan köszönjük Paul Manley-nek és Andrea Khoshdel-nek (Novartis) az imatinib és nilotinib hatóanyagok biztosítását. Szeretnénk köszönetet mondani Dr. Nagy Istvánnak a SeqOmics Biotechnológia Kft. igazgatójának, az újgenerációs RNS szekvenálásért. Valamint hálás vagyok Dr. Patócs Attilának, Dr. Marczell Istvánnak és Dr. Nagy Zsoltnak a Semmelweis Egyetem MTA-SE "Lendület" Örökletes Endokrin Daganatok Kutatócsoport tagjainak az útvonal elemzésben nyújtott professzionális segítségükért. Szeretnék köszönetet mondani, Dr. Kósa János Pál laborvezető úrnak és a labor többi munkatársának (Árendás Mónikának, Horváth Beatrixnek, Dr. Horváth Péternek, Dr. Kató Karinának, Keresztényi Györgyinek, Kontratovics Katalinnak, Korein Tamásnének, Kövesdi Andreának, Nagy György Pálnak, Sinkovics Tündének, Dr. Tóbiás Bálintnak és

Dr. Tóth Tamásnak,)), hogy az évek folyamán együtt töltött idő alatt és a közös munkák során szakmai fejlődésem túl, emberileg is fejlődhettem általuk.

Szeretném megköszönni Dr. Horváth Péter és Dr. Németh Dániel volt PhD hallgatóknak, kedves és segítőkész hozzáállásukat és azt, hogy felsőbb évesként tapasztalataikkal, tanácsaikkal segítségemre voltak. Köszönöm, Dr. Bakos Bence doktor úrnak és Dr. Holhoffer Anikó doktornőnek, hogy kedvességükkel és barátságosságukkal hozzájárultak a PhD szoba élettel teli légköréhez és ezzel színesebbé tették az ott töltött napjaimat.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném kifejezni köszönetemet, Máté Editnek, Bokori Editnek és Komlóssy Dorottyanak, a tanulmányi ügyek intézésében mutatott hozzáértő, hallgatóbarát, kedves és segítőkész hozzáállásukért.